

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

Einfluss von Vasopressin-Rezeptoren und Aquaporinen auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirntrauma

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katrín Rauen
aus Köln
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Zausinger Prof. Dr. med. Uwe Ködel Priv. Doz. Dr. med. Thomas Holzbach
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Raimund Trabold
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:	13.02.2014
-----------------------------	------------

Es ist nicht genug zu wissen, man muss auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muss auch tun.

Johann Wolfgang von Goethe
Wilhelm Meisters Wanderjahre: Makariens Archiv (Abs. 73)

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Schädel-Hirntrauma	1
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und sozioökonomische Bedeutung	1
1.1.2	Einteilung und Verletzungsmechanismus.....	1
1.1.3	Pathophysiologie	2
1.1.4	Vasogenes und zytotoxisches Hirnödem	6
1.1.5	Prognose, Komplikationen und Spätfolgen	8
1.2	Vasopressin	8
1.2.1	Aufbau, Synthese und Funktion	8
1.2.2	Vasopressin-Rezeptoren	9
1.2.3	Klinische Relevanz	11
1.3	Aquaporine – Wasserkanäle mit zerebraler Relevanz	12
1.4	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Versuchsanordnung <i>in vivo</i>	17
2.1.1	Versuchstiere.....	17
2.1.2	V _{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell.....	17
2.1.3	Versuchsplanung	17
2.1.4	Anästhesie und Monitoring	18
2.1.5	Mikrochirurgische Präparation.....	18
2.1.6	Controlled Cortical Impact	19
2.2	Experimentelles Protokoll <i>in vivo</i>	19
2.2.1	Bestimmung der physiologischen Parameter	19
2.2.2	Bestimmung des Hirnwassergehaltes	20
2.2.3	Quantifizierung des sekundären Nekrosevolumens	20
2.2.3.1	Herstellung der histologischen Präparate.....	21
2.2.4	Bestimmung der Gewichtsänderung	21
2.2.5	Evaluation der neurologischen Funktion	22
2.2.6	Mortalität	22
2.2.7	Experimentelle Gruppen	22
2.3	Analytik	22
2.3.1	Primerdesign für Aquaporin 1, 4 und 9.....	22
2.3.2	Primersequenzen.....	24
2.3.3	Primertestung und Gewebeentnahme	24
2.3.3.1	RNA Isolierung.....	24
2.3.3.2	Quantifizierung und Überprüfung der RNA Reinheit	25
2.3.3.3	Reverse Transkription.....	25
2.3.3.4	Spezifische Primer-Hybridisierung	26
2.4	Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene	27
2.4.1	Gewebeentnahme	27
2.4.2	Real-Time-PCR	28
2.4.3	Housekeeping-Gen.....	28
2.4.4	Standardkurve	29
2.4.5	Quantifizierung mit externem Standard	29
2.4.6	Experimentelle Gruppen	29
2.5	Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene	29

2.5.1	Maushirnpräparation nach Paraformaldehyd Perfusion	30
2.5.2	Herstellung der Paraffinschnitte	30
2.5.3	Immunhistochemie.....	30
2.5.3.1	Infrarot-Scan	30
2.5.3.2	Epifluoreszenzmikroskopie	31
2.5.3.3	Positiv- und Negativkontrolle	31
2.5.4	Experimentelle Gruppen	32
2.6	Statistische Analyse	33
2.6.1	Neuroprotektive Effekte im V _{1a} -Rezeptor knock-out Modell	33
2.6.2	Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene	33
2.6.3	Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf Proteinebene.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Neuroprotektive Effekte im V _{1a} -Rezeptor knock-out Modell	35
3.1.1	Physiologische Parameter	35
3.1.2	Hirnwassergehalt	36
3.1.3	Sekundäres Nekrosewachstum 24 Stunden und 7 Tage nach CCI.....	37
3.1.4	Gewichtsänderung.....	38
3.1.5	Neurologische Funktion	39
3.1.6	Mortalität	40
3.2	Analytik	40
3.2.1	Nachweis spezifischer Primer-Hybridisierung für Aquaporin 1, 4 und 9	40
3.2.2	Aquaporin 1, 4 und 9 Primer – <i>Annealing</i> Temperatur	42
3.3	Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene	42
3.3.1	Proteinspezifische Standardkurven und Standardkonzentrationen	42
3.3.2	Housekeeping-Gen.....	43
3.3.3	Relative Quantifizierung – Korrektur auf das Housekeeping-Gen.....	43
3.3.3.1	Aquaporin 1	43
3.3.3.2	Aquaporin 4	44
3.3.3.3	Aquaporin 9	45
3.4	Lokalisation und Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene	46
3.4.1	Immunhistochemische Analyse – Lokalisation von AQP1 und AQP4.....	46
3.4.1.1	Positiv- und Negativkontrolle	46
3.4.1.2	Lokalisation von AQP1 und AQP4 im gesunden Maushirn	48
3.4.1.3	Posttraumatische AQP1 und AQP4 Expression im Wildtyp	48
3.4.1.4	Posttraumatische AQP1 Lokalisation im Wildtyp und V _{1a} -Rezeptor knock-out.....	52
3.4.1.5	Posttraumatische AQP4 Lokalisation im Wildtyp und V _{1a} -Rezeptor knock-out.....	53
3.4.2	Quantifizierung von AQP1 im Wildtyp und V _{1a} -Rezeptor knock-out.....	53
3.4.3	Quantifizierung von AQP4 im Wildtyp und V _{1a} -Rezeptor knock-out.....	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Diskussion der Methode.....	57
4.1.1	Auswahl des experimentellen Trauma-Modells.....	57
4.1.2	V _{1a} -Rezeptor knock-out Modell und Validierung von Ausgangswerten.....	58
4.1.3	Auswahl der Aquaporine.....	59
4.1.4	Auswahl der Aquaporin Nachweismethoden.....	60
4.1.4.1	Quantitative Aquaporin Analyse auf mRNA Ebene	60
4.1.4.2	Quantitative Aquaporin Analyse auf Proteinebene.....	62
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	64
4.2.1	Neuroprotektive Effekte im V _{1a} -Rezeptor knock-out Modell	64

4.2.1.1	Vasopressin in der Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas	64
4.2.1.2	Verteilung der zerebralen Vasopressin-Rezeptoren	65
4.2.1.3	Molekulare Mechanismen.....	66
4.2.2	Analytik	67
4.2.3	Aquaporine	68
4.2.3.1	Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene	69
4.2.3.2	Lokalisation und Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene	70
4.2.3.3	Regulationsmechanismen	70
4.2.3.4	Aquaporin 1	71
4.2.3.5	Aquaporin 4	73
4.2.3.6	Aquaporin 9	77
4.2.4	Schlussfolgerung und klinische Bedeutung	78
5	Zusammenfassung und Ausblick	81
6	Literaturverzeichnis	84
7	Abkürzungsverzeichnis	101
8	Anhang.....	104
8.1	Nissl-Färbung	104
8.2	<i>Neurological Severity Score</i> (NSS)	104
8.3	Real-Time-PCR Protokoll.....	105
8.4	Paraffineinbettung	105
8.5	Paraffinschnitt-Protokoll	106
9	Danksagung.....	107
10	Lebenslauf	108
11	Publikationen.....	110

1 Einleitung

1.1 Schädel-Hirntrauma

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und sozioökonomische Bedeutung

Schädel-Hirnverletzungen entstehen durch äußere Gewalteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn und stellen bei Kindern zwischen dem 1. und 15. (Rickels, 2009) sowie jungen Erwachsenen bis zum 45. Lebensjahr die häufigste Krankheits- und Todesursache dar (Baethmann et al., 2002; Rickels, 2009). In Deutschland wird die aktuelle Inzidenz mit 332 Verletzten pro 100.000 angegeben (Rickels, 2009). Weltweit schwankt die Inzidenz zwischen 235 bis 556 Schädel-Hirnverletzten pro 100.000 Einwohner (Rutland-Brown et al., 2006; Tagliaferri et al., 2006; Andriessen et al., 2010). Dabei ist die Häufigkeitsverteilung zweigipflig und geschlechtsabhängig. Hauptrisikogruppen sind einerseits unter 10-jährige mit 900, sowie über 74-jährige mit 659 Verletzten pro 100.000 Einwohner. Männer sind zweimal häufiger als Frauen betroffen (Corrigan et al., 2010).

Zu den häufigsten Ursachen zählen Stürze, Verkehrsunfälle sowie Freizeitunfälle (Bruch H.-P. und Trentz O., 2008a). In den 70er Jahren wurden 50% der Schädel-Hirntraumata (SHT) durch Verkehrsunfälle verursacht. Heutzutage werden die meisten SHT durch Stürze induziert (52%), nur noch 27% sind Folge eines Unfalls im Straßenverkehr (Rickels, 2009).

Neben dem persönlichen Leiden, mit abrupter Änderung der gesamten Lebensperspektive der Betroffenen und deren Angehörige, sollte auch unbedingt die sozioökonomische Tragweite der Verletzung (Andriessen et al., 2010) mit jährlich gesamtgesellschaftlichen Kosten von 2,8 Milliarden Euro in Deutschland (Rickels E., 2006; DGNC, 2006) und 60 Milliarden US-Dollar in den USA (Corrigan et al., 2010) in Betracht gezogen werden.

1.1.2 Einteilung und Verletzungsmechanismus

Die klinische Einteilung der Schädel-Hirnverletzungen erfolgt seit vier Jahrzehnten mit der von Jennett und Teasdale implementierten Glasgow Coma Scale (GCS). Die Bewusstseinslage wird im posttraumatischen Verlauf durch die Parameter „motorische Antwort“, „Sprache“ und „Augenöffnung“ mit minimal 3 und maximal 15 Punkten beurteilt und der Schweregrad der Verletzung standardisiert dokumentiert (Teasdale und Jennett, 1974). Da diese Bewertung jedoch keine Rückschlüsse auf das jeweilige Verletzungsmuster und deren heterogene Pathologie zulässt, werden zur Klassifikation und zur Vermeidung von Störfaktoren in klinischen Studien zunehmend bildgebende Verfahren eingesetzt (Timmons, 2010).

In Deutschland werden 91% der Schädel-Hirnverletzungen als leicht (Grad I: GCS 13-15), 4% als moderat (Grad II: GCS 9-12) und 5% als schwer (Grad III: GCS \leq 8) eingestuft (DGNC, 2006; Rickels E., 2006; Klingenhöfer J. und Berthele A., 2009). Die

Mortalitätsverteilung beträgt dabei für erstgradige Schädel-Hirnverletzungen 1%, für zweitgradige 15% und für drittgradige Verletzungen bis zu 40% (Andriessen et al., 2010). Schädel-Hirnverletzungen stellen eine äußerst heterogene Krankheitsentität dar (Abbildung 1), deren Klassifikation nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen kann. Allgemein werden geschlossene von offenen sowie fokale von diffusen Verletzungsmustern unterschieden. Hauptverletzungsmechanismus ist die plötzliche seitliche Beschleunigung des Kopfes. Prädispositionsstellen für die axonale Verletzung sind die Mark-Rindengrenze, das Corpus callosum und der Hirnstamm (Strich, 1956; Gentry et al., 1988; Adams et al., 1989; Gentry, 1994; Andriessen et al., 2010). Daneben werden Akzelerations- und Dezelerationstraumata mit Ausbildung der sogenannten Coup- und Contre-Coup-Verletzung (Allen, 1896; Denny-Brown und Russell, 1941; Goggio, 1941), die Stoßverletzung sowie das Rotationstrauma unterschieden. Letzterer Mechanismus führt durch Zug- und Scherkräfte zu Gefäßeinrissen mit resultierenden, intrakraniellen Blutungen (Hacke, 2010a). Neben der fokalen Kontusionsverletzung ist der diffuse Axonschaden als Primärläsion wesentlich. (Strich, 1956; Adams et al., 1982; Mendelow und Teasdale, 1983). In einer MRT-Studie wurde ein Patientenkollektiv von 159 mittel- bis schwer Schädel-Hirnverletzter untersucht und wies die Koexistenz beider Verletzungsmuster bei 50% der Betroffenen nach (Skandsen et al., 2010).

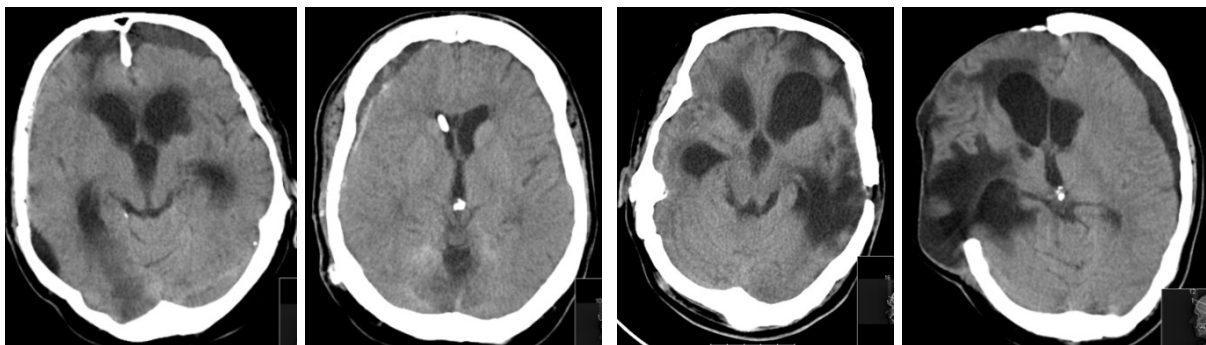


Abbildung 1: Heterogenität von Schädel-Hirnverletzungen in koronarer Ebene (CCT)

Akutes Subduralhämatom, intraparenchymatöse Verletzungen und resultierender Hydrocephalus malresorptiv steigern unter anderem den intrakraniellen Druck und verstärken das posttraumatische Hirnödem. Auf Grund der massiven Hirnschwellung mit Mittellinienverlagerung wurde zur symptomatischen Therapie eine Dekompressionskraniektomie erforderlich (*rechts*). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. med K. Trautwein, Radiologie Bad Aibling.

1.1.3 Pathophysiologie

Primärer und sekundärer Hirnschaden

Die Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas verläuft zweizeitig. Der Primärschaden entsteht direkt durch die mechanische Krafteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn und ist einer Behandlung nicht zugänglich. Intra- und extrakranielle Komplikationen führen zum sogenannten sekundären Hirnschaden. Posttraumatisches Hirnödem, intrakranieller Druckanstieg (ICP), zerebrale Minderperfusion und Hirnischämie (Abbildung 2) sowie

systemische Hypotension und Hypoxämie sind wesentlich für die Entstehung des sekundären Hirnschadens (Mendelow und Teasdale, 1983; Baethmann et al., 1998a; Baethmann et al., 1998b; Baethmann et al., 2002). Bei schwer Schädel-Hirnverletzten waren in einem Drittel bis zur Hälfte der Fälle systemische Hypotension und Hypoxämie relevant (Mendelow und Teasdale, 1983). Eine Untersuchung von Graham et al. wies bei 91% der posttraumatisch, obduzierten Gehirne einen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden nach. Hippocampus (81%) und Basalganglien (79%) waren im Vergleich zum zerebralen Kortex (46%) vorwiegend betroffen (Graham et al., 1978).

Die sogenannte *Penumbra* (lat. Halbschatten) umgibt den primären Hirnschaden und ist durch einen erloschenen Funktions- und zunächst erhaltenen Strukturstoffwechsel mit potenziell überlebensfähigen Zellen definiert.

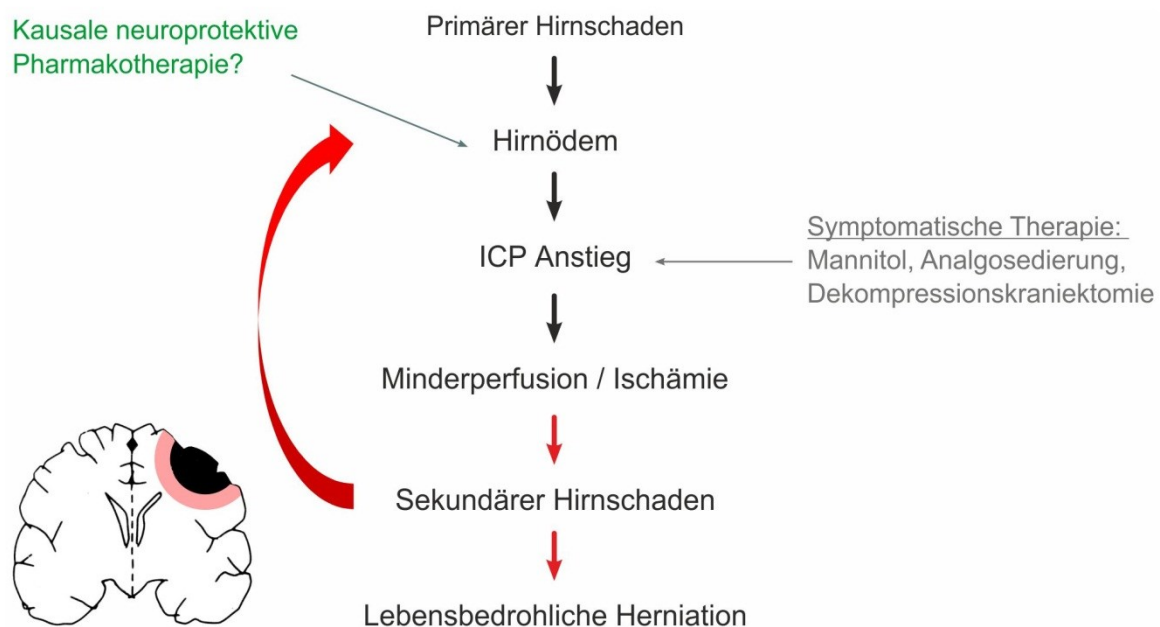


Abbildung 2: Zweizeitige Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas (SHT)

Der Primärschaden (*schwarz*) entsteht durch die mechanische Krafteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn und ist einer Therapie prinzipiell nicht zugänglich. Die sogenannte Penumbra (*rot*) ist durch einen erloschenen Funktions- und zunächst erhaltenen Strukturstoffwechsel mit potenziell überlebensfähigen Zellen definiert. Kann eine suffiziente Hirndurchblutung mit Substratangebot nicht rechtzeitig wiederhergestellt werden, führen Hirnödem, Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP), Minderperfusion und zerebrale Ischämie zum sekundären Hirnschaden. Wird dieser Circulus vitiosus nicht durchbrochen, resultiert eine lebensbedrohliche Herniation. Bisher fehlt eine kausale, neuroprotektive Pharmakotherapie des posttraumatischen Hirnödems, die die Pathophysiologie des SHT zu einem möglichst frühen Zeitpunkt positiv beeinflussen könnte.

Kann in diesem Gebiet eine suffiziente zerebrale Durchblutung mit ausreichender Sauerstoff- und Energieversorgung der Zelle sowie Ionen- und Neurotransmitter-Homöostase nicht wiederhergestellt werden, führen Hirnödem, Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP), Minderperfusion und zerebrale Ischämie zum Erliegen des Strukturstoffwechsels und zur

Entstehung des sekundären Hirnschadens. Wird dieser Circulus vitiosus nicht durchbrochen, resultiert eine lebensbedrohliche Herniation (Abbildung 2).

Durch die mangelnde Hirndurchblutung mit fehlender Sauerstoff- und Glukoseversorgung sistieren ATP-abhängige Transportprozesse und führen durch zelluläre und molekulare Kaskaden zum irreversiblen Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose (Astrup et al., 1981; Hakim, 1987; Siesjo, 1992; Hacke, 2010b). Wesentliche Faktoren der Zyto- und Neurotoxizität sind die posttraumatische Freisetzung von Glutamat, Stickstoffmonoxid (NO), Entstehung freier Radikale und Laktatazidose und führen neben dem Verlust der Kalium-, Natrium- und Calciumionen-Homöostase zur Ausdehnung des sekundären posttraumatischen Hirnödems (Takahashi et al., 1981; Mendelow und Teasdale, 1983; Katayama et al., 1990; Marmarou A., 1991; Siesjo, 1992; Siesjo, 1993; Bullock, 1993; Bullock et al., 1995; Bullock et al., 1998; Marmarou, 2003; Unterberg et al., 2004; Andriessen et al., 2010; Donkin und Vink, 2010; Hacke, 2010b).

Hirndurchblutung und intrakranieller Druck

Das Gehirn ist sowohl durch die geringe Sauerstoff- und Glukosemangeltoleranz als auch durch die rigide, knöcherne Begrenzung vulnerabel; Faktoren, die in der Pathophysiologie des SHT für die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems und sekundären Hirnschadens wesentlich sind.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Sauerstoff-, Glukose- und Energieversorgung des Gehirns durch drei Faktoren sichergestellt: erstens liegt die physiologische, zerebrale Durchblutung mit 60 bis 80 ml pro 100 g Hirngewebe und Minute weit oberhalb der Infarktschwelle, zweitens existieren Kollateralsysteme und drittens ist die Hirndurchblutung bei einem mittleren arteriellen Blutdruck zwischen 50 bis 150 mmHg durch Autoregulation mit Bayliss-Effekt blutdruckunabhängig. Nach einem SHT erliegt die Autoregulation im ischämischen Hirngewebe. Die zerebrale Durchblutung ist damit vollständig vom mittleren arteriellen Blutdruck abhängig und durch systemische Faktoren beeinflussbar (Forbes und Nason, 1937; Fog, 1938; Lassen, 1959; Harper, 1966; Muizelaar et al., 1989; Paulson et al., 1990; Bouma et al., 1992; Bouma und Muizelaar, 1992; Hacke, 2010b; Badruddin et al., 2011). Sinkt die Hirndurchblutung posttraumatisch auf 1/3 bis 1/4, resultiert der bereits oben beschriebene Verlust des Funktionsstoffwechsels. Die zerebrale Durchblutung liegt zwischen 18 bis 20 ml pro 100 g Hirngewebe und Minute und führt zunächst zu einer Ischämie mit reversibler Funktionsstörung. Bei andauerndem Energieverlust und Unterschreitung der kritischen Ischämie-Schwelle von 10 ml pro 100 g Hirngewebe und Minute resultiert der irreversible Zelltod (Astrup et al., 1981; Hakim, 1987; Siesjo, 1992; Haberl, 1994; Hakim, 1998; Unterberg et al., 2004; Siegenthaler et al., 2006; Hacke, 2010b).

Wie bereits erwähnt, ist das Gehirn durch die rigide, knöcherne Begrenzung vulnerabel. Unter physiologischen Bedingungen ist Flüssigkeit im menschlichen Gehirn auf die verschiedenen Kompartimente Liquor (75-100 ml), Blut (75-100 ml), Intrazellulärraum (1.100-

1.300 ml) und Interstitium (100-150 ml) aufgeteilt. Die Flüssigkeitsverteilung erfolgt entlang des osmotischen Gradienten und des hydrostatischen Druckes (Mendelow und Teasdale, 1983). Nach der Monroe-Kelly-Doktrin ist die Summe aus Gehirnparenchym, Liquor, arteriellem und venösem Blut bei intaktem Schädel konstant (Monroe, 1783; Kellie, 1824; Mokri, 2001). Die posttraumatische zerebrale Volumenänderung wird zunächst durch gesteigerten Liquorabfluss, erhöhte Liquorresorption, verminderte Liquorproduktion sowie vermehrten venösen Abfluss kompensiert (Greve und Zink, 2009). Das Reservevolumen wird aus den Niedrigdruck-Kompartimenten, dazu zählen Liquor und venöses System, in die Peripherie verdrängt und ausgepresst (Marmarou et al., 1980). Ist diese Reserve bei akuter Volumensteigerung, wie sie bei einem Schädel-Hirntrauma auftritt, von 20 bis 50 ml beim Erwachsenen ausgeschöpft (Bruch H.-P. und Trentz O., 2008b), kommt es durch die rigide Begrenzung des Gehirns oberhalb von 20 mmHg zum exponentiellen intrakraniellen Druckanstieg (Abbildung 3) mit konsekutiver Minderperfusion des Hirnparenchyms und führt in den, bereits in Abbildung 2, beschriebenen Circulus vitiosus.

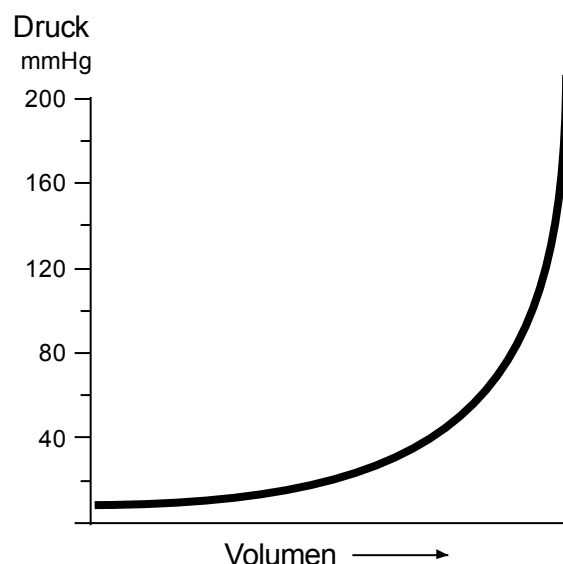


Abbildung 3: Intrakranielle Druck-Volumen-Beziehung

Anstieg des Hirnwassergehaltes führt nach Ausschöpfung des Reservevolumens zum exponentiellen Anstieg des intrakraniellen Hirndruckes. Abbildung modifiziert nach Mendelow und Teasdale (1983).

Um den Struktur- und Funktionsstoffwechsel nach Schädel-Hirnverletzungen wieder herzustellen und den sekundären Hirnschaden zu vermeiden, muss also der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die zerebrale Durchblutung mit Sauerstoff- und Energieversorgung gewährleistet sowie der ICP normalisiert werden. Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) und zerebrale Durchblutung (CBF) hängen von MAP, ICP sowie Gefäßwiderstand (R) ab, wie in Formel 1 dargestellt (Juul et al., 2000; Clifton et al., 2002; Hacke, 2010b). Ziel ist es, einen ICP unterhalb von 20 mmHg und einen zerebralen Perfusionsdruck zwischen 50 bis 70 mmHg als Voraussetzung für eine ausreichende

zerebrale Durchblutung zu erreichen. Bisher werden Analgosedierung, Mannitol, externe Ventrikeldrainage und Dekompressionskraniektomie zur symptomatischen Therapie des erhöhten ICP eingesetzt (Rosner und Daughton, 1990; Marmarou A., 1991; Robertson et al., 1999; Juul et al., 2000; Clifton et al., 2002; Andrews et al., 2002; Elf et al., 2005; Brain Trauma Foundation et al., 2007; Jaeger et al., 2010). Ein ausreichender zerebraler Perfusionsdruck wird symptomatisch durch Volumengabe, Katecholamine, Reduktion des zentralvenösen Druckes und niedrigem endexpiratorischem Druck bei der Beatmung (sogenanntes „best PEEP“ Konzept) gewährleistet (DGN, 2008).

$$\begin{aligned} \text{CPP} &= \text{MAP} - \text{ICP} \\ \text{CBF} &= \text{CPP} / \text{R} \end{aligned}$$

Formel 1: Zusammenhang der zerebralen Durchblutung und des zerebralen Perfusionsdruckes

Trotz langjähriger Forschung fehlt bisher eine kausale Pharmakotherapie zur Behandlung des posttraumatischen Hirnödems, die diesen Circulus vitiosus zu einem möglichst frühen Zeitpunkt stoppen könnte.

1.1.4 Vasogenes und zytotoxisches Hirnödem

Das posttraumatische Hirnödem ist wesentlicher Prädiktor für ein schlechtes Outcome der Betroffenen und führt in bis zu 50% der schwer Schädel-Hirnverletzten zum Tod (Marmarou, 2003). Die Hälfte des posttraumatischen Hirnödems entsteht direkt durch die initiale Verletzung und ist einer Therapie nicht zugänglich. Die andere Hälfte bildet sich sekundär und ist prinzipiell behandelbar (Zweckberger et al., 2006; Plesnila, 2007).

In der Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas sind sowohl das vasogene als auch das zytotoxische Hirnödem wesentlich (Klatzo, 1967).

Das vasogene Hirnödem entsteht direkt nach dem Trauma und verursacht eine verminderte zerebrale Durchblutung. Daraus resultiert eine Ischämie mit Bildung eines zytotoxischen Hirnödems (Kimelberg, 1995; Barzo et al., 1996; Stroop et al., 1998; Marmarou et al., 2000; Marmarou, 2003). Das vasogene Hirnödem ist durch Permeabilitätssteigerung und Öffnung der Blut-Hirn-Schranke mit proteinreichem Flüssigkeitsaustritt aus dem vaskulären Kompartiment in den Extrazellulärraum gekennzeichnet (Klatzo, 1967; Klatzo, 1994) (Abbildung 4). Diese Ödemform begleitet insbesondere den diffusen Axonschaden und resultiert in einer deutlichen intrakraniellen Volumenzunahme (Klatzo, 1967; Kimelberg, 1995; Unterberg et al., 2004; Ropper Allan H., 2009).

Im Gegensatz dazu ist das zytotoxische Ödem durch Flüssigkeitsverschiebung aus dem Interstitium in Zellen bei intakter BHS definiert. Vorrangig schwellen Gliazellen sowie in wesentlich geringem Ausmaß Endothelzellen und Neurone (Klatzo, 1967; Bourke et al., 1980; Klatzo, 1994; Ropper Allan H., 2009). Diese posttraumatisch vorherrschende

Ödemform (Marmarou et al., 2006) entsteht durch den hypoxisch-ischämischen Hirnschaden. Die perivaskulären Astrozyten sind Hauptmediatoren des zytotoxischen Hirnödems, da im menschlichen Gehirn ein Astrozyten-Neuronen-Verhältnis von 20:1 besteht und Gliazellen bis auf das Fünffache ihrer normalen Größe anschwellen können (Kimelberg, 1995; Unterberg et al., 2004). Astrozyten schwellen, da sie toxische Substanzen, die während der Ischämie in den Extrazellulärraum abgegeben werden, entlang des Natriumionen-Gradienten aufnehmen. Folge ist ein Wassereinstrom in die Astrozyten entlang des osmotischen Gradienten. Astrozyten schwellen also, da sie versuchen die Homöostase des Gehirns aufrecht zu halten (Staub et al., 1996) (Abbildung 4).

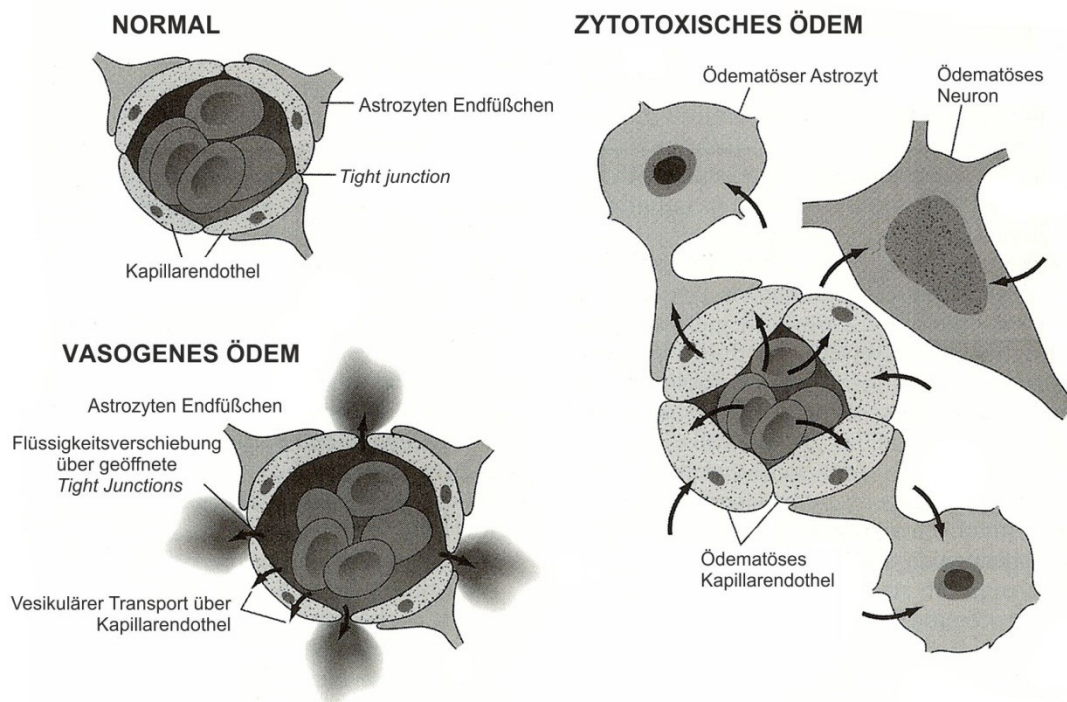


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die BHS wird durch *Tight Junctions* des Kapillarendothels gebildet und wird durch perivaskuläre Astrozyten Endfüßchen umgeben (*links oben*). Das vasogene Hirnödem (*unten links*) entsteht direkt nach SHT und ist durch Öffnung der BHS mit Permeabilitätssteigerung und Flüssigkeitsverschiebung in den Extravasaalraum definiert. Das zytotoxische Hirnödem (*rechts*) entwickelt sich in Folge des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach wenigen Tagen und persistiert für ca. 2 Wochen. Die BHS bleibt intakt. Es kommt zu einer Flüssigkeitsverschiebung mit Zellschwellung hauptsächlich in die perivaskulären Astrozyten sowie in geringerem Ausmaß in Endothelzellen und Neurone. Ursprüngliche Darstellung von Fishman, modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von The McGraw Hill Companies (Ropper Allan H., 2009).

Während sich das vasogene Hirnödem wenige Stunden nach dem Trauma ausbildet, entwickelt sich das zytotoxische Hirnödem langsam über mehrere Tage und persistiert bis zu zwei Wochen. Die Blut-Hirn-Schranke ist nach wenigen Stunden für große Plasmaproteine bereits wieder impermeabel, bleibt jedoch für kleine Moleküle bis zu sieben Tage nach dem Trauma durchgängig. Neben Matrix-Metalloproteinasen und vasoaktiven Entzündungsstoffen

sind Aquaporine (AQP) wesentliche Mediatoren des posttraumatischen Hirnödems (Manley et al., 2000; Taya et al., 2008; Papadopoulos und Verkman, 2008; Donkin und Vink, 2010). Aquaporine, hoch-spezifische Wasserkanäle, scheinen sowohl für den Wassereinstrom als auch Wasserabtransport aus dem Gehirn von Bedeutung zu sein. Die molekularen Mechanismen sind jedoch noch unzureichend aufgeklärt (Manley et al., 2000; Papadopoulos et al., 2004; Yang et al., 2008; Zador et al., 2009).

1.1.5 Prognose, Komplikationen und Spätfolgen

Zwei Faktoren bestimmen die Prognose der Betroffenen nach SHT, das sind der Unfallmechanismus inklusive der Verletzungsschwere sowie das Ausmaß des resultierenden Sekundärschadens (Mendelow und Teasdale, 1983; Baethmann et al., 2002). Marmarou konnte als Hauptprädiktor für ein schlechtes Outcome den intrakraniellen Druckanstieg über 20 mmHg und als zweitwichtigsten Faktor den systemischen Blutdruckabfall unter 80 mmHg nachweisen (Marmarou A., 1991). Wie bereits oben beschrieben, ist der ICP Anstieg Folge des posttraumatischen Hirnödems. Schwer Schädel-Hirnverletzte sind nicht nur präklinisch, sondern auch in der frühen klinischen Phase diesen Komplikationen mit resultierenden sekundären Insulten ausgesetzt (Marshall et al., 1979; Andrews et al., 1990; Sharples et al., 1990; Marmarou A., 1991; Chesnut et al., 1993; Manley et al., 2001; Baethmann et al., 2002; Schreiber et al., 2002; McHugh et al., 2007).

Die Heterogenität von Schädel-Hirnverletzungen bildet sich auch in den diversen Spätfolgen ab. Neurologische Herdsymptome sind in der Regel geringer ausgeprägt als psychopathologische und kognitive Defizite (Jennett und Bond, 1975; Mazaux et al., 2002; Hacke, 2010c; O'Donnell et al., 2013).

1.2 Vasopressin

1.2.1 Aufbau, Synthese und Funktion

Vasopressin, Synonym für Arginin-Vasopressin (AVP) und Antidiuretisches Hormon (ADH), wurde erstmals 1895 von Oliver und Schäfer beschrieben (Oliver und Schafer, 1895). Vasopressin ist ein zyklisches Nonapeptid und wird in den Perikarya der magnozellulären Neurone des Hypothalamus synthetisiert; hauptsächlich im Nucleus supraopticus und im Nucleus paraventricularis. Vasopressin wird an das Transportprotein Neurophysin II gebunden und gelangt über axonalen Transport in die Neurohypophyse, wo es in sekretorischen Vesikeln gespeichert wird. AVP wird über das fenestrierte Endothel des Kapillarplexus der Arteria hypophysialis inferior in den Blutkreislauf sezerniert; die bedarfsgerechte Freisetzung wird vor allem über Osmo- und Barorezeptoren gesteuert (Verney, 1947; Schrier et al., 1979; Weitzman und Kleeman, 1979; Russell et al., 1980; Sofroniew, 1983; Sklar und Schrier, 1983; Bourque und Olié, 1997; Birnbaumer, 2000; Maybauer et al., 2008). Die peripheren Funktionen von Vasopressin sind bereits gut bekannt. Die systemische Blutdruckregulation wird über V₁-Rezeptoren und die renale Regulation der

Wasserhomöostase über V_2 -Rezeptoren vermittelt (Abbildung 5) (Oliver und Schafer, 1895; Birnbaumer, 2000; Holmes et al., 2003; Maybauer et al., 2008).

Vasopressin scheint auch zentrale Funktionen zu haben, die bisher noch unzureichend verstanden sind. Bargmann und Scharrer konnten die Existenz von Vasopressin in extrahypothalamischen Neuronen zeigen (Bargmann und Scharrer E, 1951). Zentral scheint Vasopressin als Neurotransmitter und Neuromodulator zu fungieren (Buijs, 1978; Sofroniew, 1983; Raggenbass, 2008). Tierexperimentell sind der Einfluss von Vasopressin auf die Wasserpermeabilität zentraler Kapillaren (Raichle und Grubb, Jr., 1978; Doczi et al., 1984; Doczi, 1993), der Einfluss auf die zentrale Ionenhomöostase (DePasquale et al., 1989; Cserr und Latzkovits, 1992), die Reduktion der zerebralen Durchblutung zum Plexus choroideus mit verminderter Liquorproduktion (Faraci et al., 1988) sowie *in vitro* die Zunahme des Astrozytenvolumens nachgewiesen (Del Bigio und Fedoroff, 1990; Latzkovits et al., 1993). Für die vorliegende Arbeit sind die zentrale Bedeutung von Vasopressin für die posttraumatische Hirnödementstehung und der mögliche Einfluss auf die zerebrale Wasserpermeabilität wesentlich. Die Auswirkungen von Vasopressin auf den posttraumatischen sekundären Hirnschaden werden im Folgenden näher dargelegt.

1.2.2 Vasopressin-Rezeptoren

Vasopressin-Rezeptoren gehören zur Proteinsuperfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind durch sieben hydrophobe Transmembran- α -Helices aufgebaut. Es sind drei Vasopressin-Rezeptor-Subtypen bekannt: V_{1a} -, V_{1b} - und V_2 -Rezeptoren. In der Literatur wird der V_{1b} -Rezeptor alternativ auch als V_3 -Rezeptor bezeichnet und scheint einen variablen Signalweg zu haben (Thibonnier et al., 1997). Allgemein haben V_{1a} -Rezeptoren peripher vaskuläre, V_{1b} -Rezeptoren hypophysäre und V_2 -Rezeptoren renale Bedeutung.

V_{1a} -Rezeptoren

Peripher sind V_{1a} -Rezeptoren auf glatten Muskelzellen kleiner Arterien, Arteriolen und postkapillärer Venolen lokalisiert und regulieren über Vasokonstriktion den systemischen Blutdruck.

Die intrazelluläre Signaltransduktion der V_{1a} -Rezeptoren wird über den $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten-Rezeptor vermittelt und führt zur intrazellulären Erhöhung der Calciumionen-Konzentration (Barberis et al., 1998; Thibonnier et al., 1998; Birnbaumer, 2000; Holmes et al., 2003; Maybauer et al., 2008). Bindet Vasopressin an den V_{1a} -Rezeptor, dissoziiert GTP und aktiviert mit der α_q -Untereinheit die Phospholipase C β (PLC β). Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP $_2$) wird zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Tri-Phosphat (IP3) hydrolysiert. Der sekundäre Botenstoff IP3 führt durch Bindung an den IP3-Rezeptor zur Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und erhöht die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration. Der sekundäre Botenstoff DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), woraus eine veränderte Zellaktivität, Genexpression und ein

intrazellulärer Calciumionen-Einstrom resultieren (Abbildung 5) (Birnbauer, 2000; Maybauer et al., 2008).

Dieser Signalweg führt peripher, wie bereits erwähnt, über den Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration zur Vasokonstriktion kleiner Arterien, Arteriolen und postkapillärer Venolen und zur systemischen Blutdruckregulation.

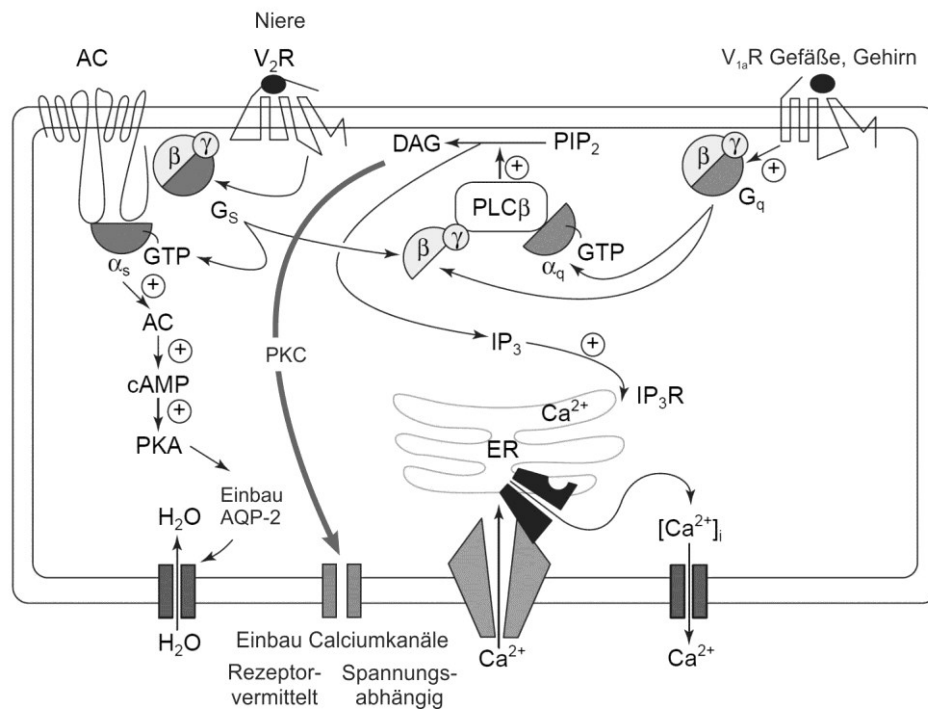


Abbildung 5: Vasopressin-Rezeptoren und ihre G-Protein-gekoppelten intrazellulären Signalkaskaden

In der Niere vermittelt Vasopressin über V_2 -Rezeptoren (*links*) den bekannten antidiuretischen Effekt und gewährleistet die Wasserhomöostase. Die intrazelluläre Signalkaskade bewirkt über Proteinkinase A (PKA) den Einbau von Wasserkanälen, Aquaporin 2 (AQP2), und die bedarfsgerechte Wasserrückresorption. Peripher sind V_{1a} -Rezeptoren (*rechts*) auf glatten Gefäßmuskeln exprimiert und vermitteln die systemische Blutdruckregulation von Vasopressin. Die aktivierte Proteinkinase C (PKC) führt zu einer erhöhten intrazellulären Calciumionen-Konzentration. Abbildung modifiziert nach Birnbauer (2000).

Unter physiologischen Bedingungen sind V_{1a} -Rezeptoren im zentralen Nervensystem von Ratten weit verbreitet. Insbesondere konnten V_{1a} -Rezeptoren auf Neuronen des frontoparietalen Kortex aller Hirnschichten sowie auf oberflächlichen Astrozyten und Gefäßen nachgewiesen werden (Szot et al., 1994; Ostrowski et al., 1994; Szmydynger-Chodobska et al., 2004). In der Pathophysiologie von Hirnverletzungen scheinen V_{1a} -Rezeptoren von Bedeutung zu sein. Es konnte bereits tierexperimentell gezeigt werden, dass die pharmakologische V_1 -Rezeptorinhibition das Hirnödem und den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirntrauma, nach experimenteller intrazerebraler Blutung sowie nach experimentellem Schlaganfall signifikant mindert. Die pharmakologische Hemmung des V_2 -Rezeptors blieb ohne zerebralen Effekt (Vakili et al., 2005; Kleindienst et al., 2006; Okuno et al., 2008; Trabold et al., 2008; Taya et al., 2008; Manaenko et al., 2011).

Möglicherweise spielt auch die V_{1a} -Rezeptor-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Pathophysiologie von Hirnverletzungen eine Rolle. NF- κ B führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren, wodurch die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) gestört wird (Neves et al., 2002; Polavarapu et al., 2005). Der Verlust der BHS führt nach SHT, wie bereits oben beschrieben, zum vasogenen Hirnödem. Vasopressin verstärkt möglicherweise V_{1a} -Rezeptor-vermittelt das posttraumatische Hirnödem.

V_2 -Rezeptoren

In der Niere vermitteln V_2 -Rezeptoren die Wasserrückresorption und damit den antidiuretischen Effekt von Vasopressin. V_2 -Rezeptoren sind basolateral auf Hauptzellen im distalen Konvolut des Tubulus und des Sammelrohrs der Niere lokalisiert und bewirken über eine intrazelluläre Kaskade den Einbau von Wasserkanälen (Aquaporin 2). Die Signaltransduktion des V_2 -Rezeptors führt über den $G_{s/\alpha}$ -Protein-gekoppelten-Rezeptor zur intrazellulären Erhöhung der Adenylatcyclase (AC), wodurch der *second messenger* cAMP erhöht und die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird. Aquaporin 2 (AQP2) ist in Vesikeln gespeichert. Die aktivierte PKA führt zur Fusion der Vesikel mit der Zellmembran und zum Einbau von AQP2 in die apikale Membran der Hauptzellen. Folge ist die bedarfsgerechte, V_2 -Rezeptor-vermittelte, renale Wasserrückresorption (Abbildung 5) (Deen et al., 1994; Knepper und Inoue, 1997; Neves et al., 2002; Holmes et al., 2003; Maybauer et al., 2008; Fenton und Moeller, 2008).

1.2.3 Klinische Relevanz

Vasopressin scheint eine klinische Relevanz nach Schädel-Hirnverletzungen zu haben. Eine kontrollierte prospektive Untersuchung von 30 moderat und schwer Schädel-Hirnverletzten konnte zeigen, dass die Höhe des Vasopressin-Serumspiegels positiv mit der Schwere der Hirnläsion korreliert und Vasopressin möglicherweise die Hirnödementstehung beeinflusst (Xu et al., 2007). In einer weiteren Studie wurden 62 ältere Patienten, die ein Trauma mit und ohne Hirnbeteiligung erlitten, untersucht und mit einem nicht verletzten Alterskollektiv verglichen. Auch in dieser Studie korrelierte die Höhe des Vasopressin-Serumspiegels mit der Schwere der Hirnläsion (Huang et al., 2003). Nach ischämischem Schlaganfall wurden erhöhte Vasopressin-Serumspiegel nachgewiesen und waren unabhängig von Osmo- und Barorezeptor-Mechanismen (Barreca et al., 2001). Eine etwas größere klinische Studie untersuchte 243 Patienten mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Eine erhöhte Liquor-Vasopressin-Konzentration wurde nur bei Patienten mit erhöhtem intrakraniell Druck nachgewiesen. Der Vasopressin-Plasmaspiegel korrelierte im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht zur Plasmaosmolalität (Sorensen et al., 1985).

Zusammenfassend kann aufgrund der bisherigen Datenlage eine klinische Relevanz von Vasopressin in der posttraumatischen und postischämischen Pathophysiologie angenommen werden. Zentral scheint Vasopressin eine Bedeutung bei Erkrankungen mit intrakraniellm Druckanstieg und möglicherweise für die Entstehung des Hirnödems zu haben. Tierexperimentell scheinen V_{1a} -Rezeptoren eine wesentliche Rolle in der posttraumatischen Hirnödementstehung zu spielen.

1.3 Aquaporine – Wasserkanäle mit zerebraler Relevanz

Das Gehirn ist auf ein wirksames Volumen- und Ionengleichgewicht seiner vier Flüssigkeitskompartimente, wie bereits oben dargestellt, angewiesen (Monroe, 1783; Kellie, 1824; Fishman, 1974; Strange, 1992; Gullans und Verbalis, 1993; Nielsen et al., 1997; Mokri, 2001; Zador et al., 2007; Pasantés-Morales und Cruz-Rangel, 2010). Zelluläre Membranen sind für die meisten polaren Verbindungen, wie auch Wasser, impermeabel. Obgleich die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eine messbare Wasserpermeabilität aufweist, ist diese für die hohe Umsatzrate spezieller Gewebe wie Gehirn, Niere, Gefäßsystem, sekretorische Drüsen und Lunge nicht ausreichend (Finkelstein, 1987; Preston und Agre, 1991; Preston et al., 1992; Agre et al., 1993; Nielsen et al., 1993a; Folkesson et al., 1994; Yool, 2007).

Neben Diffusion und Ionen-Co-Transport erfolgt ein 5- bis 50-fach schnellerer (Verkman, 2011), hochspezifischer, bidirektionaler und energieunabhängiger Wassertransport entlang des osmotischen Gradienten über die lipophile Zellmembran durch Wasserkanäle, die sogenannten Aquaporine (AQP). Erstmals wurde die molekulare Struktur 1991 von Gregory Preston und Peter Agre beschrieben (Preston und Agre, 1991; Preston et al., 1992). 2003 erhielten die US-Amerikaner Peter Agre und Roderick MacKinnon für diese Entdeckung und Strukturaufklärung den Nobelpreis für Chemie. Bereits 1993 konnte AQP1 (Agre et al., 1993; Nielsen et al., 1993a), im darauf folgenden Jahr AQP4 im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Hasegawa et al., 1994; Jung et al., 1994a).

Aquaporin Einteilung

In Säuge- und Nagetieren sowie auch in humanem Gewebe sind bisher 13 AQP Subtypen, AQP0-12, beschrieben (Magni et al., 2006; Tait et al., 2008; Walz et al., 2009). Es werden drei Untergruppen unterschieden: erstens Aquaporine für den alleinigen Wassertransport (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8), zweitens Aquaglyceroporine für den zusätzlichen Transport von Glycerin, Harnstoff und Monocarboxylate wie Lactat und β -Hydroxybutyrat (AQP3, 7, 9, 10) sowie drittens die sogenannten Super-Aquaporine AQP11 und AQP12. Letztere sind vermutlich aufgrund einer Genduplikation entstanden. Sie weisen eine 20%ige Homologie zu den übrigen Aquaporinen auf und sind für intrazelluläre Prozesse von Bedeutung (Verkman und Mitra, 2000; Badaut et al., 2002; Morishita et al., 2004; Itoh et al., 2005; Gorelick et al., 2006; Ishibashi, 2006; Gonen und Walz, 2006; Rojek et al., 2008; Walz et al., 2009; Zelenina, 2010; Badaut et al., 2011). Aquaporine werden auch hinsichtlich ihrer

Wasserpermeabilität eingeteilt. AQP0, 6, 9 und 10 zählen zu den niedrig, AQP1, 2, 3, 4, 5, 7 und 8 zu den hoch wasserpermeablen Kanälen (Walz et al., 2009).

Aquaporin Struktur

Aquaporine weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Sie sind aus ca. 300 Aminosäuren aufgebaut und bilden 6 α -helikale Transmembrandomänen (Abbildung 6). Das Konsensus-Motiv aus Asparagin – Prolin – Alanin (N-P-A) bildet je eine Halbpore. Zwei Halbporen lagern sich zu einem Monomer mit einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa zusammen und bilden den hochspezifischen und bidirektionalen Wasserkanal. In der Zellmembran lagern sich vier Aquaporin-Monomere zu Homotetrameren zusammen (Abbildung 7).

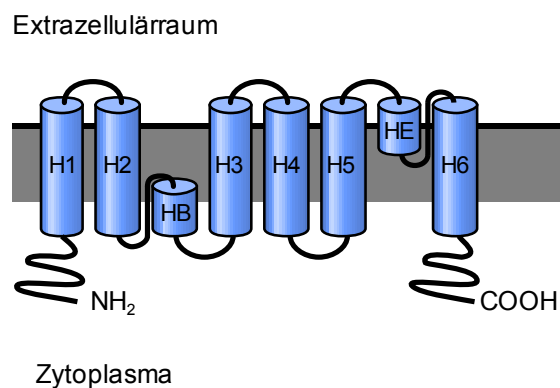


Abbildung 6: Aquaporin Monomer

Aquaporine sind Transmembranproteine, die aus je zwei Halbporen ein Monomer bilden. Jedes Monomer besteht aus 6 α -helikalen Transmembrandomänen (H1-H6) sowie 2 kurzen Segmenten (HB, HE), die den hochspezifischen Wasserkanal bilden. Abbildung modifiziert nach Verkman (2011).

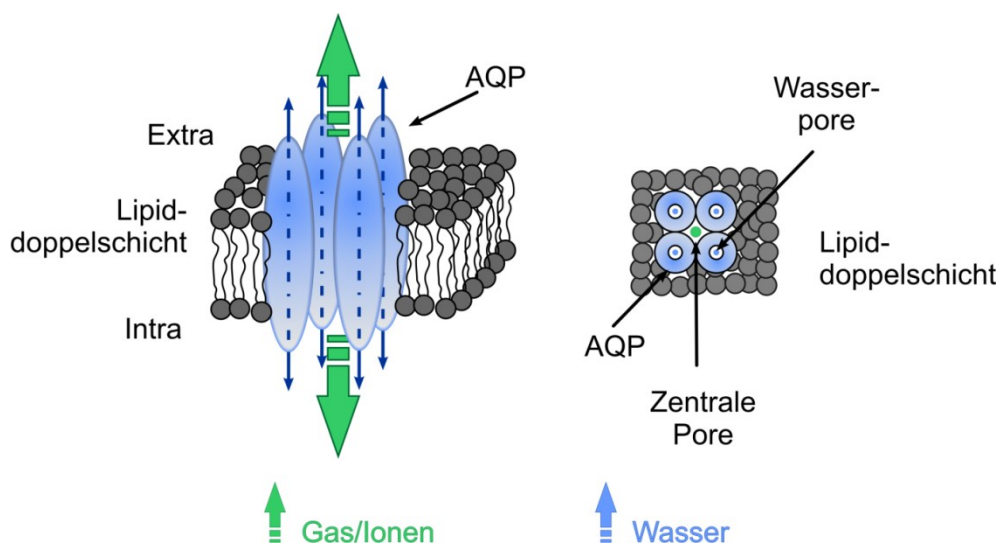


Abbildung 7: Aquaporin Homotetramer

Aquaporine (blau) bilden in der lipophilen Zellmembran Homotetramere und gewährleisten einen 5- bis 50-fach schnelleren, bidirektionalen, hochspezifischen und energieunabhängigen Wassertransport entlang des osmotischen Gradienten. Über eine zentrale Pore ist teilweise auch ein Gas- und Ionentransport möglich (grün); seitliche Ansicht (links), Ansicht von oben (rechts). Abbildung modifiziert nach Badaut et al. (2011).

Der Selektivitätsfilter des Wasserkanals misst an der engsten Stelle zwischen 2,8 bis 3,4 Å. Die elektrostatische Barriere entsteht durch protonierte Arginin-Seitenketten und verhindert die Passage von Ionen und protonierten Wassermolekülen. Sieben Wassermoleküle passieren gleichzeitig durch präzise Umschwenkbewegung des Dipolmoleküls Wasser in unter 1 ns jeweils einen Wasserkanal. (Preston und Agre, 1991; Preston et al., 1994; Jung et al., 1994b; Heymann et al., 1998; Murata et al., 2000; Verkman und Mitra, 2000; Badaut et al., 2002; Löffler G. et al., 2007; Hub et al., 2009; Khalili-Araghi et al., 2009; Zelenina, 2010; Verkman, 2011).

Aquaporine im Nagerhirn

In kultivierten Zellen von Nagern wurden *in vitro* 7 Aquaporin Subtypen beschrieben (Albertini und Bianchi, 2010; Badaut et al., 2011). *In vivo* wurden im Nagerhirn bisher die Aquaporine 1, 4 und 9 nachgewiesen (Badaut et al., 2007; Zelenina, 2010).

Aquaporin 1, 4 und 9

Aquaporin 1 wurde zuerst auf Erythrozyten, später in der Niere und anderen Epithelzellen entdeckt. Während systemisch AQP1 auf Kapillarendothel exprimiert wird (Nielsen et al., 1993a), ist das zerebrovaskuläre Kapillarendothel unter physiologischen Bedingungen frei von AQP1 (Kobayashi et al., 2001; Zelenina, 2010); wesentliche Voraussetzung für eine intakte Blut-Hirn-Schranke.

Zerebral wurde AQP1 bisher apikal auf dem Epithel des Plexus choroideus detektiert. Neben einem konstitutiven Wassertransport hat AQP1 eine zentrale Bedeutung für die Liquor-Produktion und Liquor-Zirkulation. AQP1 knock-out Mäuse haben eine um 25% geringere Liquor-Produktion sowie einen verminderten intrakraniellen Druck. Nach schwerem fokalem Schädel-Hirntrauma konnte bereits gezeigt werden, dass AQP1 knock-out Mäuse einen um 60% signifikant niedrigeren ICP und ein signifikant besseres Überleben gegenüber Wildtyp Mäusen haben (Nielsen et al., 1993a; Hasegawa et al., 1994; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Oshio et al., 2005; Praetorius und Nielsen, 2006).

Aquaporin 4 ist der vorherrschende Wasserkanal im Säugetiergehirn und ist an den Grenzflächen der Hirnoberfläche, der Blut-Hirn- sowie Blut-Liquor-Schranke lokalisiert. Die höchste AQP4 Dichte wurde auf den perivaskulären und subpialen Astrozyten Endfüßchen nachgewiesen. Damit ist die AQP4 Expression überwiegend polar organisiert (Jung et al., 1994a; Nielsen et al., 1997; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Yukutake und Yasui, 2010). Funktionell ist AQP4 wesentlich an der Wasserregulation im ZNS beteiligt. Tierexperimentell konnte an AQP4 knock-out Mäusen ein erhöhter Hirnwassergehalt nach vasogenem Hirnödem und ein niedrigerer Hirnwassergehalt nach zytotoxischem Hirnödem detektiert werden (Manley et al., 2000; Verkman, 2000; Manley et al., 2004; Papadopoulos et al., 2004; Verkman et al., 2006; Papadopoulos und Verkman, 2007; Zador et al., 2007; Zador et al., 2009).

Aquaporin 9 zählt zu den Aquaglyceroporinen und wird am stärksten in der Leber exprimiert (Badaut et al., 2011). Im Gehirn wurde AQP9 auf Astrozyten, katecholaminergen Neuronen und Endothelzellen der subpialen Blutgefäße nachgewiesen. Die Bedeutung von AQP9 im Gehirn ist bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt; eine Beteiligung am zerebralen Energiemetabolismus wird postuliert (Elkjaer et al., 2000; Badaut et al., 2001; Badaut et al., 2004; Badaut et al., 2008; Badaut, 2010; Arcienega et al., 2010; Badaut et al., 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Wassertransport über die lipophile Zellmembran neben Diffusion und Ionen-Co-Transport vor allem effizient und hochspezifisch über Aquaporine erfolgt. Während Diffusion ein sehr langsamer Prozess ist, erfolgt der Wassertransport über Aquaporine mit einer 5- bis 50-fach höheren Geschwindigkeit entlang des osmotischen Gradienten und zwar energieunabhängig.

In der Niere ist der antidiuretische Effekt von Vasopressin, wie bereits in Abschnitt 1.2.2 dargestellt, sehr gut bekannt. Die systemische Wasserhomöostase wird über V_2 -Rezeptoren vermittelt und führt über eine intrazelluläre Kaskade zum konsekutiven Einbau von in Vesikeln gespeicherten Wasserkanälen, den Aquaporinen 2. Dieser kurzfristige Regulationsmechanismus ermöglicht in der Niere eine bedarfsgerechte, schnelle und effektive Wasserrückresorption. Ob zerebrale Aquaporine einer ähnlichen, Vasopressin-vermittelten, Kurzzeitregulation über V_{1a} -Rezeptoren unterliegen und diese Regulation wesentlich für die posttraumatische Hirnödementstehung ist, ist bisher unzureichend geklärt und wird unter anderem in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Tierexperimentell konnte bisher bereits eine wesentliche Rolle von AQP1 für den posttraumatischen intrakraniellen Druckanstieg gezeigt werden. AQP4 scheint in der Pathophysiologie des Hirnödems unterschiedliche Funktionen zu haben. Beim vasogenen Hirnödem scheint AQP4 den Hirnwasserabtransport zu vermitteln und ist damit protektiv. Dagegen wird das zytotoxische Hirnödem durch AQP4 verstärkt.

Insgesamt sind die zeitlichen und molekularen Mechanismen, die den Wassertransport in der Pathophysiologie des posttraumatischen Hirnödems regulieren, bisher noch wenig verstanden. Neben der Untersuchung der posttraumatischen Expression zerebraler Aquaporine im Mausmodell, ist die Frage nach V_{1a} -Rezeptor-vermittelter Kurz- und Langzeitregulation der Aquaporine im zeitlichen Verlauf nach Controlled Cortical Impact wesentlicher Fokus dieser Arbeit.

1.4 Fragestellung

Die posttraumatische Hirnödementstehung und der konsekutive intrakranielle Druckanstieg führen zum sekundären Hirnschaden und gehören zu den wesentlichen Prädiktoren für ein schlechtes neurologisches Ergebnis von Patienten mit Schädel-Hirntrauma (SHT). Bisher fehlt eine kausale und neuroprotektive Pharmakotherapie des posttraumatischen Hirnödems, die die Entstehung des sekundären Hirnschadens und damit die Pathophysiologie des SHT zu einem möglichst frühen Zeitpunkt positiv beeinflussen könnte. Die molekularen Mechanismen der posttraumatischen Hirnödementstehung sind noch unzureichend verstanden. Vasopressin, V_{1a} -Rezeptoren sowie Aquaporine scheinen für die posttraumatische Hirnödementstehung und für den posttraumatischen sekundären Hirnschaden von Bedeutung zu sein, so dass sich folgende Fragen ergeben:

1. Können die neuroprotektiven Effekte einer pharmakologischen Hemmung des V_{1a} -Rezeptors an einem V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell detektiert werden?
2. Welchen Einfluss hat die genetische V_{1a} -Rezeptor Defizienz auf den Hirnwassergehalt, das sekundäre Nekrosewachstum, die Körpergewichtsänderung, die neurologische Funktion sowie auf die Mortalität nach Controlled Cortical Impact?
3. Welche Bedeutung haben Aquaporin 1, 4 und 9 für den Hirnwassertransport und für die Hirnödementstehung im zeitlichen Verlauf nach Controlled Cortical Impact?
4. Welchen Einfluss hat der V_{1a} -Rezeptor auf die Expression zerebraler Aquaporine im zeitlichen Verlauf nach Controlled Cortical Impact im Mausmodell?

2 Material und Methoden

Die Versuche wurden am Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Zeit von August 2008 bis Dezember 2010 durchgeführt. Die vorliegende Untersuchung umfasst vier Abschnitte. Im ersten Abschnitt wurden die neuroprotektiven Effekte im V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell gegenüber Wildtyp Tieren nach Controlled Cortical Impact (CCI) untersucht. Im zweiten Abschnitt wurden murine Primer für die im Maushirn relevanten Aquaporine 1, 4 und 9 hergestellt. Im dritten Abschnitt wurden Aquaporin 1, 4, und 9 auf mRNA Ebene mit Real-Time-PCR quantitativ in unbehandelten Hirnen von Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen sowie im posttraumatischen Verlauf analysiert. Im vierten und letzten Abschnitt wurden die zerebralen Aquaporine immunhistochemisch auf Proteinebene in unbehandelten und im posttraumatischen Verlauf sowohl in V_{1a} -Rezeptor knock-out und Wildtyp Maushirnen lokalisiert und quantifiziert.

2.1 Versuchsanordnung *in vivo*

2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche C57/BL6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) als Wildtyp und homozygote V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse ($V_{1a}^{-/-}$) verwendet (Koshimizu et al., 2006). Das Körpergewicht betrug 18-25 g. Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur von 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem regelmäßigen Licht-/Dunkelzyklus gehalten. Futter und Wasser war den Tieren jeder Zeit frei zugänglich. Die Tierexperimente erfolgten nach den Bestimmungen der Regierung von Oberbayern unter dem Tierversuchsantrag 117/05.

2.1.2 V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell

Die über mehrere Generationen gekreuzten, homozygoten V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse ($V_{1a}^{-/-}$) erhielten wir freundlicherweise von Prof. Tsujimoto von der Universität Kyoto/Japan. Der initiale genetische Background basierte auf 129 Sv und C57/BL6J Mäusen. Der V_{1a} -Rezeptor wurde durch Entfernung von Teilen des ersten Exons und Introns inaktiviert (Koshimizu et al., 2006).

2.1.3 Versuchsplanung

Die Tiere wurden jeweils randomisiert den Gruppen „nativ“, also unbehandelt, versus „Trauma“ zugeordnet. In den Trauma-Gruppen wurde der Zeitpunkt der Hirnentnahme jeweils erst unmittelbar nach der Trauma-Applikation randomisiert festgelegt. Der Untersucher war gegenüber dem Genotyp verblindet.

2.1.4 Anästhesie und Monitoring

Für die Narkoseeinleitung wurden die Mäuse für 2 Minuten mit Isofluran 4% und für weitere 2 Minuten mit einem Isofluran-Sauerstoff-Lachgasgemisch (Isofluran 2%, O₂ 30% und N₂O 68%) in einer Kammer anästhesiert. Während der Operationszeit wurde die Narkose mit dem oben genannten Isofluran-Sauerstoff-Lachgasgemisch über Maske aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Temperatursonde und rückgekoppelter Heizplatte bei 37°C während der gesamten Versuchsdauer überwacht und konstant gehalten.

2.1.5 Mikrochirurgische Präparation

Der Kopf und Oberkiefer der tief anästhesierten Tiere wurde 0° horizontal und 3° nach links gedreht in einem Stereotaxie-Rahmen (Small Animal Steriotactic Frame, Model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, Ca, USA) fixiert. Zum Schutz vor Austrocknung, Haut- und Schleimhautverletzung wurden die Augen, das Fell im Bereich des Hautschnittes und der Anus mit Wundsalbe behandelt (Bepanthen®, Bayer Vital, Leverkusen). Die Kopfhaut wurde durch eine 15 mm lange fronto-okzipitale Inzision in der Medianlinie eröffnet und die Galea stumpf ab präpariert. Unter ständiger Kühlung mit einer Natriumchlorid-Lösung (NaCl) 0,9% wurde eine L-förmige Kraniotomie über dem rechten Parietallappen durchgeführt. Dafür wurde die Schädelkalotte entlang des Ansatzes des Musculus temporalis und der rechten Sutura lambdoidea mit dem Präzisionsbohrer (Rewatronic Products, Wald-Michelbach, Deutschland) bei 16-facher Vergrößerung (Mikroskop, Carl Zeiss, Deutschland) eröffnet. Die Schädelkalotte wurde unter Schonung der Dura mater und des Sinus sagittalis superior an der Sutura sagittalis nach oben geklappt. Die Dura mater wurde durch physiologische NaCl-Lösung feucht gehalten und ihre Unversehrtheit mikroskopisch überprüft (Abbildung 8) (Zweckberger, 2006).

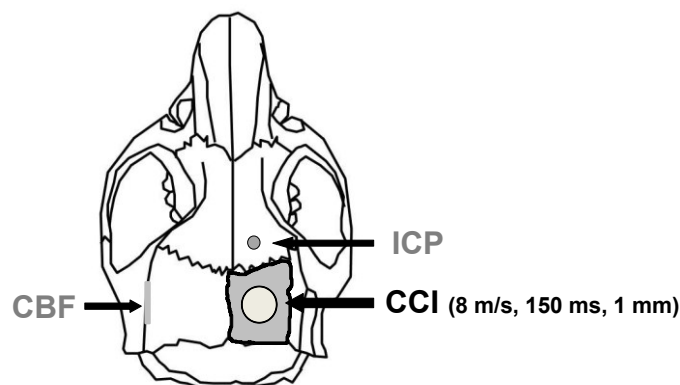


Abbildung 8: Kraniale Fensterung über dem rechten Parietallappen

Das Controlled Cortical Impact (CCI) mit den angegebenen Parametern entspricht einem mittelschwerem SHT und wurde jeweils über dem rechten parietalen Kortex ausgelöst. Der intrakranielle Druck (ICP) wurde ipsilateral, die zerebrale Durchblutung (CBF) kontralateral bestimmt.

2.1.6 Controlled Cortical Impact

Das experimentelle Schädel-Hirntrauma (SHT) wurde standardisiert nach dem Protokoll des Controlled Cortical Impact ausgelöst (Smith et al., 1995; Hannay et al., 1999; Zweckberger et al., 2003). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein mittelschweres SHT mit einer Geschwindigkeit von 8 m/s, einer Kontaktzeit von 150 ms, einem Durchmesser von 3 mm und einer Eindringtiefe von 1 mm mit einem Bolzenschussgerät (Abbildung 9) (MouseKatuscha 2000, L. Kopacz, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland) senkrecht zur intakten Hirnoberfläche appliziert (Smith et al., 1995; Hannay et al., 1999; Zweckberger et al., 2003). Über eine Laserlichtschranke wurden sowohl Bolzen-Kontaktzeit als auch Bolzen-Geschwindigkeit für jedes CCI erfasst. Die Eindringtiefe des Bolzens in das Hirnparenchym wurde exakt und standardisiert mit der Mikrometerschraube vor jeder Trauma-Applikation justiert. Oberflächliche Blutungen wurden mit sterilen Tupfern (Sugi®, Kettenbach, Eschenburg, Deutschland) gestillt, der Situs mit physiologischer NaCl-Lösung gespült, die Schädelkalotte wieder verschlossen und mit einem Gewebekleber (Vetbond, 3M, St. Paul, USA) fest fixiert. Abschließend erfolgte die Hautnaht durch drei Einzelknopfnähte (5-0 Ethibond, Johnson und Johnson, Brüssel, Belgien) (Zweckberger, 2006). Die Mäuse erholten sich postoperativ für 30 Minuten in einem Inkubator bei 33°C.

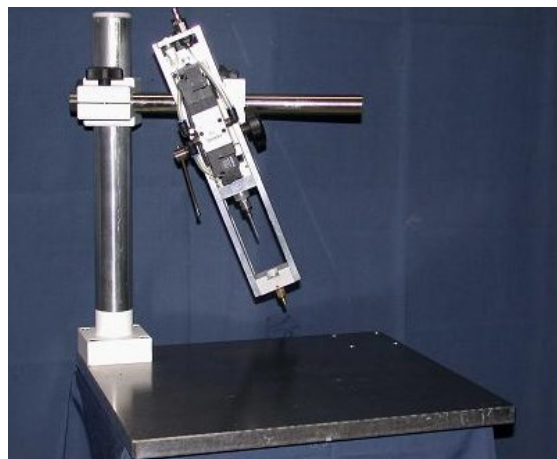


Abbildung 9: Trauma-Applikator

Ein mittelschweres SHT wurde standardisiert senkrecht zur intakten Hirnoberfläche mit einer Geschwindigkeit von 8 m/s, einer Kontaktzeit von 150 ms, einem Durchmesser von 3 mm und einer Eindringtiefe von 1 mm verursacht (MouseKatuscha 2000, L. Kopacz, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland).

2.2 Experimentelles Protokoll *in vivo*

2.2.1 Bestimmung der physiologischen Parameter

Zunächst wurden Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse hinsichtlich ihrer physiologischen Parameter verglichen. Im zeitlichen Verlauf 3 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI wurden mittlerer arterieller Druck (MAP), intrakranieller Druck (ICP) sowie die kontralaterale zerebrale Durchblutung (CBF) gemessen und aufgezeichnet. Die

Tiere wurden dafür durch intraperitoneale Injektion mit Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht), Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach orotrachealer Intubation erfolgte eine mechanische, mikrokapnographisch kontrollierte Beatmung mit 30% Sauerstoff und 70% Raumluft (Minivent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hungstetten; Micro Capnograph CI240, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Der systemische Blutdruck sowie Blutgase wurden über einen Femoral-Arterien-Katheter überwacht (Portex, Hythe, England). Die zerebrale Durchblutung wurde mit einer Laser-Doppler-Sonde (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) über der kontralateralen Hemisphäre gemessen (Plesnila et al., 2001). Dafür wurde die Glasfaser-Messsonde (Probe 418/1, Perimed, Stockholm, Schweden) im Bereich des Ursprunges des Musculus temporalis senkrecht zum Stromgebiet der A. cerebri media platziert und mit Cyanoacrylat Kleber befestigt. Der intrakranielle Druck wurde rostral des CCI intraparenchymatös mit maßgefertigter Messsonde nach Bohrlochtrepantation bestimmt (Abbildung 8) (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Mammendorf) (Zweckberger et al., 2003; Terpolilli et al., 2009).

2.2.2 Bestimmung des Hirnwassergehaltes

Zur Bestimmung des Hirnwassergehaltes wurden die Maushirne von unbehandelten Tieren und 24 Stunden nach CCI entnommen. Dafür wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation in tiefer Narkose getötet. Nach medianem Hautschnitt über dem Schädel wurde das Nasenbein frei präpariert, quer durchtrennt und die Sutura sagittalis mit einer Schere eröffnet. Beide Ossa parietales wurden vorsichtig zur Seite geklappt. Das Gehirn wurde mit einem Dissektor vom Rückenmark und der Schädelbasis abgetrennt, entnommen und in eine gekühlte Hirn-Matrix gelegt. Zur Präparation der Hemisphären wurden die Bulbi olfactorii und das Cerebellum mit einer Rasierklinge abgetrennt und entfernt. Die Hemisphären wurden exakt entlang der Fissura longitudinalis cerebri mit einer Rasierklinge getrennt. Jede Hemisphäre wurde separat in ein Glasschälchen (Wägegglas 35 x 30 mm, Schott AG, Jena) mit bekanntem Leergewicht gelegt. Anschließend wurde das Feuchtgewicht (wet weight: ww) in der verschlossenen Schale gemessen (Mettler Toledo, Giessen). Zur Bestimmung des Trockengewichtes (dry weight: dw) wurde jede Hemisphäre bei 120°C für 24 Stunden in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) getrocknet und erneut gewogen. Der Hirnwassergehalt als Parameter für die posttraumatische Hirnödementwicklung wurde durch die Differenz beider Werte in Bezug zum Ausgangsgewicht in Prozent angegeben und mit folgender Formel berechnet: $\text{Hirnwassergehalt in \%} = [(ww-dw/ww)*100]$ (Terpolilli, 2008).

2.2.3 Quantifizierung des sekundären Nekrosevolumens

Die Hirne wurden 15 Minuten nach Trauma zur Detektion des Primärschadens und damit zur Ermittlung des Ausgangsvolumens sowie 24 Stunden und 7 Tage nach CCI zur Bestimmung

des sekundären Nekrosevolumens untersucht. Die Maushirne wurden, wie unter 2.2.2 bereits beschriebenen, entnommen, unmittelbar auf Trockeneis gelegt und anschließend bei minus 80°C tiefgefroren.

2.2.3.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die tiefgefrorenen Maushirne wurden zunächst eingebettet (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europa, Zoeterwoude, NL). Anschließend wurden Gefrierschnitte mit Hilfe eines Kryostats (CryoStar HM 560; Microm, Walldorf, Deutschland) hergestellt. Ausgehend von den Bulbi olfactorii wurden zunächst 1000 µm Hirngewebe verworfen. Im Abstand von 500 µm wurden in 15 Schnittebenen 10 µm dünne koronare Hirnschnitte in dreifacher Ausführung angefertigt, auf Objektträger transferiert und bei minus 20°C für 24 Stunden getrocknet. Für die Quantifizierung des Hirnschadens wurde die Nissl-Färbung verwendet (siehe Anhang 8.1).

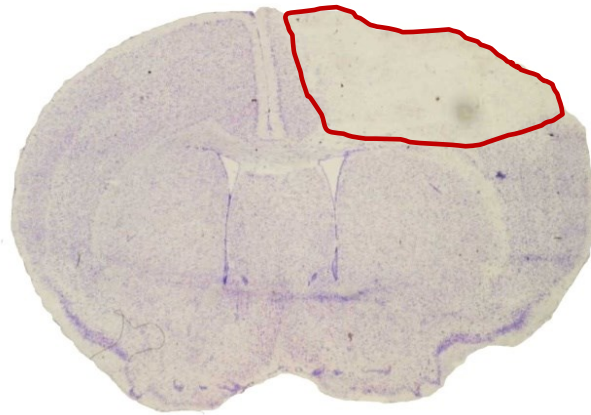


Abbildung 10: Koronarer Maushirnschnitt mit sekundärer Nekrose 24 Stunden nach CCI (Nissl-Färbung)

Das Läsionsvolumen wurde histomorphometrisch unter Verwendung einer digitalen Kamera und eines Bildverarbeitungsprogrammes bestimmt (Olympus BX 41; Olympus DP-soft, München, Deutschland). Dazu wurden alle auf den koronaren Hirnschnitten (n=15) sichtbaren Läsionsflächen (Abbildung 10) aufsummiert und mit dem Abstand der Schnitte (500 µm) multipliziert. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe folgender Formel: $V_{\text{dir}} (\text{mm}^3) = d \cdot (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)$ mit V_{dir} = direkte Volumenberechnung der Nekrose, d = Distanz 0,5 mm, A = Fläche in mm^2 und n = Anzahl (15 Schnitte).

2.2.4 Bestimmung der Gewichtsänderung

Die posttraumatische Gewichtsänderung stellt einen Parameter für den Allgemeinzustand der Maus dar. Das Tiergewicht wurde einmal präoperativ und an 7 posttraumatischen Tagen bestimmt. Die Gewichtsänderung wurde in Prozent des Ausgangsgewichtes dargestellt.

2.2.5 Evaluation der neurologischen Funktion

Die neurologische Funktion wurde mit dem *Neurological Severity Score* (NSS) (Terpolilli et al., 2009) 1 Tag vor und an 7 Tagen nach dem applizierten Trauma überprüft. Alle Tiere hatten einen initialen Neuroscore von 0 bis maximal 1,5. Mit dem NSS werden verschiedene Einzelleistungen der motorischen Funktion und der Koordination getestet. Die beste Leistung wurde mit 0 und die schlechteste Leistung mit 19 Punkten bewertet. Beurteilte Einzelparameter waren: Verlassen eines Reifens, Suchen, Bewegungsinitiation, Laufen, Hemiparese, Balancieren auf einem Balken, Balancieren und Greiffunktion (siehe Anhang 8.2).

2.2.6 Mortalität

Das posttraumatische Überleben wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen bestimmt.

2.2.7 Experimentelle Gruppen

Die Zielparameter wurden an C57/BL6 und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wie in Tabelle 1 dargestellt, untersucht. Folgende Gruppengrößen wurden verwendet: physiologische Parameter C57/BL6 (n=7), $V_{1a}^{-/-}$ (n=4); Hirnwassergehalt C57/BL6 nativ (n=7), 24 Stunden nach CCI (n=10), $V_{1a}^{-/-}$ nativ (n=6) und 24 Stunden nach CCI (n=8); primäres Nekrosevolumen C57/BL6 15 Minuten nach CCI (n=8); sekundäres Nekrosewachstum C57/BL6 und $V_{1a}^{-/-}$ 24 Stunden nach CCI (je n=8); sekundäres Nekrosewachstum 7 Tage nach CCI, Gewichtsänderung, Neuroscore und Mortalität C57/BL6 und $V_{1a}^{-/-}$ (je n=7).

Zielparameter	Wildtyp (C57/BL6)	V_{1a} -Rezeptor knock-out
Physiologische Parameter	n=7	n=4
Hirnwassergehalt	n=7 (nativ) n=10 (24 h nach CCI)	n=6 (nativ) n=8 (24 h nach CCI)
Primäres Nekrosevolumen	n=8 (15 min nach CCI)	
Sekundäres Nekrosewachstum	n=8 (24 h nach CCI) n=7 (7 Tage nach CCI)	n=8 (24 h nach CCI) n=7 (7 Tage nach CCI)
Gewichtsänderung NSS Mortalität	n=7	n=7

Tabelle 1: Übersicht über die experimentellen Gruppen

2.3 Analytik

2.3.1 Primerdesign für Aquaporin 1, 4 und 9

Um die mRNA Expression der im Maushirn relevanten Wasserkanäle AQP1, AQP4 und AQP9 mit dem Verfahren der quantitativen Real-Time-PCR zu quantifizieren, mussten zunächst spezifische Primer entwickelt werden. Dafür wurden die Richtlinien „*Guidelines for PCR*“ der Firma Qiagen befolgt

(www.qiagen.com/literature/benchguide/pdf/1017778_benchguide_chap_2.pdf). Die murinen AQP1, AQP4 und AQP9 Sequenzen erhielten wir aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mit Hilfe der *Ensemble*-Datenbank wurden die Transkripte für AQP1, AQP4 und AQP9 gesucht. Da es für AQP4 und AQP9 Splicevarianten gibt, wurde jeweils das längste Transkript gewählt (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Gen (Mus musculus)	Genlocus (Chromosom)	Exons	Transkript-länge	Translations-länge	Splice-Variante
AQP1	6	4	2627 bp	269	nein
AQP4	18	6	1688 bp	355	ja
AQP9	9	6	2643 bp	321	ja

Tabelle 2: Parameter für die Entwicklung muriner AQP1, AQP4 und AQP9 Primer

Die Primer wurden mit dem elektronischen Programm „*Primer 3 Input Version 0.4.0*“ gesucht (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Kriterien waren eine optimale Primerlänge von 22 Basenpaaren (Bp), ein Guanin/Cytosin-Anteil (GC) von 55% und eine optimale Schmelztemperatur (T_m) von 62°C. Um Fehlbindungen der Primer zu vermeiden, wurden für das Primer 3' Ende Thymin, Guanin- und Cytosin-Tripletts sowie komplementäre Basenpaare vermieden (Tabelle 3) (Rozen und Skaletsky, 2000).

Primer Parameter	
Primer Länge	18 - 22 - 27bp
Schmelztemperatur (T _m)	57 - 62 - 68°C
Guanin/Cytosin-Anteil (GC)	20 - 55 - 80%
3' Ende des Primers	Vermeidung von: <ul style="list-style-type: none"> • Guanin oder Cytosin Tripletts • Thymin • komplementären Basenpaaren

Tabelle 3: Kriterien für die Herstellung optimaler Primer mit dem elektronischen Programm *Primer 3*

Für die jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden ähnliche Schmelztemperaturen angestrebt, die mit der sogenannten Wallace-Regel [$T_m = 2^\circ\text{C (AT)} + 4^\circ\text{C (GC)}$] berechnet wurden. Die gewählten Primer wurden auf ihre spezifische Bindung mit dem sogenannten „*Primer BLAST*“ überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Zusätzlich wurden die gewählten Primer mit einer elektronischen reversen PCR getestet und ebenfalls auf ihre spezifische Bindung überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>). Für die quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR) wurde eine optimale Produktlänge von maximal

200 Basenpaaren (bp) angestrebt. Für β -Aktin wurde der bereits im Labor etablierte Primer verwendet.

2.3.2 Primersequenzen

Es wurden die in Tabelle 4 dargestellten Primersequenzen verwendet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und wurden entsprechend dem angegebenen Protokoll in RNase freiem Wasser aufgelöst. Für die 20 μ molare Lösung wurde eine Verdünnung von 1:5 angesetzt.

Gen	Vorwärtsprimer 5' - 3'	Rückwärtsprimer 5' - 3'	PCR Produktlänge
β -Aktin	CTACGAGGGCTATGCTCTCCC	CCGGACTCATCGTACTCCTGC	602bp
AQP1	ACTACACTGGCTGCGGTATCAA	CGTCAGCATCCAGGTCATACTC	222bp
AQP4	CAGTGTGGTTGGAGGATTGG	CCAGTAACATCAGTTCGTTTGGA	144bp
AQP9	CAAGCAGTCCTCAGTCGAGAAA	AGCTGAGCTCCCACATAAAAGG	194bp

Tabelle 4: Entwickelte Primersequenzen für AQP1, AQP4 und AQP9

Um die mRNA Expression von AQP1, AQP4 und AQP9 mit dem Verfahren der quantitativen Real-Time-PCR zu quantifizieren, war die Entwicklung von spezifischen Primern Voraussetzung. Für β -Aktin wurde der bereits im Labor etablierte Primer verwendet.

2.3.3 Primertestung und Gewebeentnahme

Die entwickelten Primer wurden an Leber, Pankreas, Niere und Gehirn einer C57/BL6 Maus auf spezifische Bindung und Produktlänge sowie Wasser als Negativkontrolle überprüft. Dafür wurde eine C57/BL6 Maus durch intraperitoneale Injektion von 0,4 ml Chloralhydrat tief narkotisiert. 3 Minuten nach Injektion wurde steril eine 1,5 cm lange mediane Laparotomie durchgeführt und Leber, Pankreas und Niere entnommen. Das Maushirn wurde, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, entnommen. Die Organe wurden entsprechend ihrem Gewicht mit der 10-fachen Menge RNeasy[®] der Firma Ambion, Darmstadt, bei 4°C für 24 Stunden inkubiert.

2.3.3.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte gemäß dem Protokoll des RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dafür wurde zunächst das Gewebe homogenisiert, die Zellen vollständig lysiert und die Nukleoprotein-Komplexe aufgespalten. Durch Chloroform wurden die Phasen aufgetrennt. In weiteren Schritten wurde die RNA-Präzipitation auf einer Membran erreicht und schließlich die hoch aufgereinigte RNA ausgespült und isoliert. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt. 24 Stunden nach oben beschriebener Inkubation (siehe Abschnitt 2.3.3) wurde der RNeasy[®] Überstand vorsichtig vom Gewebe abgeschüttet. Das Gewebe wurde homogenisiert und die Zellen vollständig lysiert (TissueRuptor, Bochem, Weilburg, Deutschland). Die Nukleoprotein-Komplexe wurden mit 2 x 500 μ l Reagenz (QIAzol Lysis Reagent) zur effizienten Lyse von Fett- und Standard-

Gewebe versetzt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur aufgespalten. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform, erneutes Schütteln für 15 Sekunden, Inkubation für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugieren bei 12.000 g für 15 Minuten bei 4°C wurde eine Phasentrennung erreicht. 580 µl RNA-Lösung wurde sehr vorsichtig aus der abgetrennten, oberen und wässrigen Phase abpipettiert, mit 580 µl Ethanol (70%) versetzt und maschinell geschüttelt. Das RNA-Ethanol-Gemisch wurde zu gleichen Teilen zweizeitig in ein Membrangefäß (RNeasy® Spin Column) pipettiert, bei ≥ 8.000 g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zweimal zentrifugiert und das Zentrifugat jeweils verworfen. Auf die Membran wurde 700 µl Pufferlösung (RW 1 Buffer) pipettiert, um die RNA weiter aufzureinigen. Es wurde erneut bei ≥ 8.000 g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zentrifugat erneut verworfen. Dann wurden zweizeitig je 500 µl einer weiteren Pufferlösung (RPE Buffer) auf die Membran pipettiert, mit ≥ 8.000 g für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zentrifugat jeweils verworfen. Zur abschließenden Auswaschung der RNA von der Membran wurde zweizeitig je 30 µl RNase freies Wasser pipettiert und jeweils bei ≥ 8.000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde dafür zweimalig gewechselt, so dass die RNA nun hoch aufgereinigt und isoliert war.

2.3.3.2 Quantifizierung und Überprüfung der RNA Reinheit

Die isolierte RNA wurde mit einem Photometer quantifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Dafür wurde aus jeder hoch aufgereinigten RNA Probe 2,5 µl RNA in 60 µl RNase freies Wasser abpipettiert. Als erstes wurde die Negativprobe Wasser photometrisch zum Ausschluss von Fehlerquellen gemessen und dann die RNA Konzentration für jede Probe photometrisch bestimmt. Zum Ausschluss von Kontamination, wurden die Proben auf ihre RNA Reinheit mit dem 260/230 bzw. 260/280-Quotienten photometrisch überprüft. Reine Nukleinsäuren haben einen 260/230-Wert ≥ 2 und einen 260/280 zwischen 1,8 und 2 (Armbrecht, 2008). Die photometrische Bestimmung der RNA Konzentration wurde auf 1 µg RNA nach folgender Formel berechnet: $[x \text{ µl} = 1 \text{ µg RNA/tatsächliche RNA in µg} \times 1000 \text{ µl}]$.

2.3.3.3 Reverse Transkription

Die cDNA wurde aus der jeweiligen hoch aufgereinigten RNA durch reverse Transkription gemäß dem QuantiTect® Protokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland) synthetisiert. Das Prinzip beruht auf der Elimination genomischer DNA und anschließender reversen Transkription. Für die Elimination der genomischen DNA wurden 2 µl Pufferlösung (gDNA Wipeout Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland), 1 µg RNA (Template) und RNase freies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 14 µl pipettiert und der Reaktionsmix für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Das jeweilige RNA Volumen wurde, wie bereits unter 2.3.3.2 beschrieben, photometrisch bestimmt. Für den zweiten Schritt wurde der sogenannte Master Mix nach Protokoll (Qiagen, Hilden, Deutschland) hergestellt. Dafür wurden 1 µl reverse Transcriptase (Quantiscrypt) mit

RNAse Inhibitor, 4 µl Pufferlösung (Quantiscript RT Buffer) mit Mg^{2+} und den cDNA Synthesebausteinen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) sowie 14 µl RNA (Template) aus der gDNA-Eliminierungsreaktion pipettiert. Die reverse Transkription erfolgte im MasterCycler Gradient® (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 42°C für 15 Minuten und abschließender Inkubation bei 95°C für 3 Minuten. Die angegebenen Volumina ergaben 20 µl cDNA. Um RNA Degradation zu vermeiden, wurden die Proben umgehend auf Eis gekühlt.

2.3.3.4 Spezifische Primer-Hybridisierung

Um die spezifische Primer-Hybridisierung an den ausgewählten Gewebeproben Leber, Pankreas, Niere und Gehirn zu überprüfen, wurde zunächst durch eine qualitative PCR jeweils die ideale *Annealing* Temperatur für AQP1, 4 und 9 mit dem MasterCycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ermittelt. Anschließend wurde mit den cDNA-Amplifikaten der vier verschiedenen Gewebeproben eine Gelelektrophorese durchgeführt. Unter UV-Licht (UV-Box, BioRad Gel Doc 1000, München, Deutschland) konnte nun die erwartete Produktlänge und die spezifische Bandenbildung für AQP1, 4 und 9 an den vier verschiedenen Geweben fotografisch dokumentiert werden.

2.3.3.4.1 Qualitative PCR

Die ideale *Annealing* Temperatur für die AQP1, 4 und 9 Primer wurde an Nieren cDNA einer C57/BL6 Maus und Wasser als Negativkontrolle durch das Verfahren der qualitativen PCR bestimmt. Ausgehend von der empfohlenen Temperatur wurde die ideale *Annealing* Temperatur in 2°C Schritten abwärts mit dem MasterCycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ermittelt. Ausgangstemperatur für AQP1 und 9 war 57°C und für AQP4 64°C. Die PCR durchlief 35 Zyklen entsprechend dem, in Tabelle 5 dargestellten, Protokoll. Zur Durchführung der qualitativen PCR wurde ein PCR-Mix hergestellt. Dafür wurden 0,2 µl DNA-Polymerase (GoTaq®, Promega, Mannheim (# M3175)), 0,4 µl dNTPs (5 PRIME, Mix Desoxynucleotide, # 2201200, 200 µl; 10 mM), 0,5 µl Vorwärtsprimer, 0,5 µl Rückwärtsprimer, 4 µl Pufferlösung (Promega, Mannheim), 1 µl DNA (Template) und 14,9 µl RNase freies Wasser pipettiert.

1.	Initialphase	3 Minuten	95°C
2.	Denaturierung	30 Sekunden	95°C
3.	<i>Annealing</i> AQP1, 9/AQP4 (je 2°C abwärts)	40 Sekunden	57°C/64°C
4.	Elongation	1 Minute	72°C
5.	Letzte Elongation	5 Minuten	72°C
6.	Abkühlung		4°C
35 Zyklen: Schritt 2.-4.			

Tabelle 5: Parameter der qualitativen PCR mit dem MasterCycler Gradient®

In einem weiteren Schritt wurde eine qualitative PCR an cDNA von Leber, Pankreas, Niere, Gehirn und Wasser als Negativkontrolle durchgeführt. Ziel war es die entwickelten Primer auf ihre Produktlänge und ihre spezifische cDNA-Amplifikation zu überprüfen. Es wurde das bereits beschriebene Pipettier- und Zyklusprotokoll und die entwickelten Primer verwendet. Die idealen *Annealing* Temperaturen waren 57°C für AQP1 und AQP9 bzw. 64°C für AQP4.

2.3.3.4.2 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel angefertigt. Dafür wurde 100 ml TAE-Puffer (50-fach verdünnt) und 1,5 g Agarosepulver in einem Erlenmeyerkolben 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Erhitzen wurde auf einem Magnetrührer (Ika-Combimag RCO, Staufen i. Breisgau, Deutschland) die Lösung exakt auf 100 ml mit TAE-Puffer aufgefüllt. Nach Abkühlen wurde 6 µl hitze- und lichtinstabiles Ethidiumbromid in die Puffer-Lösung pipettiert. Das flüssige Gel wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer gefüllt. Entstandene Luftblasen wurden beseitigt. Mit Hilfe zweier Kämme wurden Pipettierkammern hergestellt. Nun wurde das Gel mit Alufolie abgedeckt und lichtgeschützt für 45 Minuten getrocknet. In die Pipettierkammer wurde 6 µl blaue Marker-Lösung, bestehend aus 4 µl H₂O, 1 µl Marker und 1 µl Loading Dye (100 bp DNA Ladder Gene Ruler™, Fermentas), pipettiert. In die benachbarten Pipettierkammern wurde je 11 µl der Positivkontrolle pro Gewebe und Zielprotein und 11 µl Wasser als Negativkontrolle pro Zielprotein pipettiert. Bei einer Einstellung von 100 Volt und 400 mA wurde die Gelelektrophorese jeweils für 25 Minuten durchgeführt. Wie bereits oben beschrieben, wurde das Ergebnis unter UV-Licht (UV-Box, Bio Rad Gel Doc 1000, München) überprüft und fotografisch dokumentiert.

2.4 Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene

2.4.1 Gewebeentnahme

Die Hirnentnahme erfolgte nach zervikaler Dislokation in tiefer Narkose, wie unter 2.2.2 bereits beschrieben. Die entnommenen Hirne wurden auf eine gekühlte und RNase freie Matrix gelegt. Für die Quantifizierung der jeweiligen Zielprotein-mRNA wurde der traumatisierte rechte obere und der kontralaterale linke untere Quadrant à 60 mg präpariert. Zunächst wurde ein 4 mm breites Maushirnpräparat durch zwei koronare Schnitte mit einer Rasierklinge hergestellt. Die koronaren Schnittebenen waren rostral und kaudal der Traumaläsion bzw. bei nativen Hirnen im entsprechendem Areal über dem Parietallappen. Der sagittale Schnitt erfolgte entlang der Fissura longitudinalis cerebri. Die transversale Schnittebene lag unterhalb des Nekroseareals, so dass der kontralaterale untere Quadrant sicher nekrosefrei war. Nach beschriebenem Protokoll wurde aus den Hirnpräparaten zunächst die RNA isoliert und dann cDNA synthetisiert.

2.4.2 Real-Time-PCR

Für die quantitative Analyse von AQP1, 4, und 9 auf mRNA bzw. cDNA Ebene wurde das Verfahren der Real-Time-PCR angewendet. Dafür wurde der LightCycler® 1.5 verwendet (Roche, Heidelberg, Deutschland). Zur Datenanalyse wurde die LightCycler® Software eingesetzt (Version 3.5, Roche, Heidelberg, Deutschland). Zunächst wurden die ermittelten zielgenspezifischen *Annealing* Temperaturen durch Schmelzkurvenanalyse an den LightCycler® 1.5 adaptiert. Die optimalen *Annealing* Temperaturen waren für β -Aktin und AQP1 57°C, für AQP4 61°C und für AQP9 59°C. Für jedes Zielgen und für β -Aktin wurde eine Standardkurve erstellt und eine externe Standardkonzentration ermittelt. Um AQP1, 4 und 9 cDNA jeweils im ipsilateralen/traumatisierten oberen und kontralateralen unteren Quadranten zu quantifizieren, wurden mindestens zwei PCR-Läufe pro Zielprotein und Probe nach PCR Protokoll durchgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde neben den Gewebeproben, ein sogenannter Standard des Zielgens mit bekannter Konzentration und Wasser als Negativkontrolle mitgeführt. Entsprechend dem Roche-Protokoll wurden die Proben pipettiert: 1 μ l cDNA, 1 μ l Primer-Mix, 2 μ l Roche-Mix und 6 μ l sterilisiertes und destilliertes Roche-Wasser. Dabei wurde für den Primer-Mix 90 μ l H₂O, je 5 μ l Vorwärts- und Rückwärtsprimer angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde jeweils durch den sogenannten *Hotstart* für 10 Minuten bei 95°C begonnen. Es wurden anschließend 40 Zyklen zur cDNA Amplifikation, entsprechend der in Tabelle 6 dargestellten Schritten, durchlaufen.

1.	<i>Hotstart</i>	10 Minuten	95°C
2.	Denaturierung	5 Sekunden	95°C
3.	<i>Annealing</i> β -Actin, AQP1, AQP4, AQP9	10 Sekunden	57°C, 57°C, 61°C, 59°C
4.	Elongation	15 Sekunden	72°C
5.	Abkühlung	30 Sekunden	40°C
40 Zyklen: Schritt 2.-4.			

Tabelle 6: Protokoll der quantitativen Real-Time-PCR mit dem LightCycler®

2.4.3 Housekeeping-Gen

β -Aktin wurde als Housekeeping-Gen (HKG) gewählt. β -Aktin war geeignet, da es nach Controlled Cortical Impact bereits etabliert war (Thal et al., 2008). In unserer Reevaluation wurde β -Aktin ebenfalls 6 und 24 Stunden nach CCI nicht signifikant hoch reguliert. Die quantifizierte Zielgen cDNA wurde jeweils auf die β -Aktin cDNA nach der Standardkurven-Methode korrigiert, um Schwankungen in den Gewebeproben auszugleichen (Hunt, 2010) (Formel 2).

$$\begin{aligned} &\text{Verhältnis Zielgenexpression korrigiert auf Housekeeping-Genexpression (in \%)} \\ &= (\text{Zielgenexpression (cDNA) pro Zeitpunkt} / \text{Housekeeping-Genexpression} \\ &\quad (\text{cDNA) pro Zeitpunkt}) \times 100\% \end{aligned}$$

Formel 2: Korrektur des Zielproteins auf das Housekeeping-Gen

2.4.4 Standardkurve

Die Erstellung einer Standardkurve für jedes Zielprotein und das HKG erlaubt eine relative cDNA-Quantifizierung. Als externer Standard wurde diejenige Konzentration nahe der erwarteten Zielgen-Konzentration gewählt. Zur Erstellung der Standardkurven für jedes Zielprotein und HKG wurde eine Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^0 erstellt. Das initiale Amplifikat entstammte der qualitativen PCR. Für die Verdünnung wurde 0,5 µl Amplifikat in 50 µl H₂O pipettiert. Für jede weitere Verdünnung wurden jeweils 5 µl der vorhergehenden Verdünnung in 45 µl H₂O pipettiert. Die Standardkurve für jedes Zielgen und HKG wurde mit der quantitativen RT-PCR ermittelt. Um mögliche Pipettierfehler sowie Verunreinigung zu detektieren, wurden pro Verdünnung je 2 Proben sowie Wasser als Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf mitgeführt. Für jede Standardkurve wurde ein Fehler $e < 0,2$ (Quadrat der Fehler vom Mittelwert der Einzelwerte) als akzeptabel betrachtet.

2.4.5 Quantifizierung mit externem Standard

Zur relativen cDNA-Quantifizierung pro Probe wurde in jedem PCR-Lauf ein externer Standard mit bekannter Konzentration mitgeführt. Für β -Aktin und AQP1 wurde eine Standardkonzentration von 10^3 , für AQP4 und AQP9 von 10^4 verwendet.

2.4.6 Experimentelle Gruppen

Um die mRNA Expression von AQP1, 4 und 9 zu quantifizieren, wurden C57/BL6 (n=10) und $V_{1a}^{-/-}$ Mäuse (n=11) verwendet. Die Hirnentnahme erfolgte von unbehandelten (nativen) Mäusen sowie 24 Stunden nach CCI von C57/BL6 und $V_{1a}^{-/-}$ Mäusen. C57/BL6 Maushirne wurden auch 6 Stunden nach CCI untersucht.

2.5 Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene

Um AQP1 und AQP4 auf Proteinebene zu lokalisieren und zu quantifizieren, wurden koronare Maushirn-Paraffinschnitte hergestellt und in unserem Kooperationslabor in Lausanne, Schweiz bzw. später in Loma Linda, Kalifornien, USA, unter Leitung von Prof. J. Badaut ausgewertet. Unser, auf diesem Gebiet weltweit führendes, Kooperationslabor konnte bisher noch keinen spezifischer Antikörper für AQP9 entwickeln, so dass die Ergebnisse für AQP9 noch ausstehen.

2.5.1 Maushirnpräparation nach Paraformaldehyd Perfusion

Die Maushirnpräparation wurde nach etabliertem Perfusionsprotokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten durchgeführt. 3 Minuten nach intraperitonealer Injektion von 0,4 ml Chloralhydrat (3,6%) waren die Mäuse tief narkotisiert, so dass die linke Herzkammer präpariert werden konnte. Dafür wurde eine Oberbauchquerlaparotomie entlang der unteren Thoraxapertur durchgeführt. Das Diaphragma wurde ventral und lateral von den Rippen abgetrennt, die Brusthöhle eröffnet und das Xyphoid mit einer sogenannten „3. Hand“ fixiert. Der linke Ventrikel wurde mit einer Venenverweilkanüle (25 G) punktiert, mit einem Nadelhalter fixiert und das rechte Atrium eröffnet. Das Gesamtblutvolumen von ungefähr 2 ml wurde durch langsame, manuelle Perfusion von 20 ml isotoner Kochsalzlösung über den linken Ventrikel bis zur Entfärbung der Leber ausgespült. Die hellgelbe und entfärbte Leber diente als Hinweis auf die systemische Blutleere. Nun wurden 30-40 ml Paraformaldehyd (PFA 4%, pH=7,4) über einen Perfusor perfundiert. Die Hirnentnahme erfolgte nach oben beschriebenem Prinzip. Die Maushirne wurden 24 Stunden in 4%igem PFA im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Hirne in Einbettkassetten eine Stunde fließend gewässert und bis zur Paraffineinbettung in 70%igem Ethanol im Kühlschrank gelagert.

2.5.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Um die Maushirn-Paraffinschnitte herzustellen, wurde gemäß Mausatlas (Paxinos, 2001) 1,8 mm nach dem Bregma begonnen (siehe Anhang Paraffinschnitt-Protokoll 8.5). Pro Maushirn wurden 110 Paraffinschnitte in 11 Ebenen mit je 10 Kopien in einem Abstand von 500 µm pro Ebene angefertigt. Die Schnittdicke betrug 4 µm.

2.5.3 Immunhistochemie

AQP1 und AQP4 wurde jeweils sowohl in unbehandelten (nativen) Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen als auch im zeitlichen Verlauf nach CCI immunhistochemisch lokalisiert und quantifiziert. Um methodische Fehler in Zusammenhang mit Sekundärantikörpern zu minimieren, wurden zwei Verfahren, Infrarot-Scan und die Fluorochrome-Methode, zur Detektion der Zielproteine eingesetzt.

2.5.3.1 Infrarot-Scan

Für den immunhistochemischen Nachweis mit Infrarot-Scan wurden aufgereinigte, kommerziell erhältliche, polyklonale Kaninchen-Antikörper für AQP1 und AQP4 (Chemicon International, Temecula, Kalifornien, USA) sowie monoklonale Maus-Antikörper für GFAP (Glial fibrillary Acidic Protein) und NeuN (Neuronal Nuclei) (Chemicon International, Temecula, Kalifornien, USA) verwendet. GFAP ist ein Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen. NeuN ist ein Neuronen spezifisches Zellkernprotein. Die verwendeten Antikörper, anti-GFAP bzw. anti-NeuN, dienten dem Astrozyten- bzw. Neuronenkernnachweis.

Die Maushirn-Paraffinschnitte wurden für die Antigengewinnung mit 0,1 molarer Citrat-Puffer-Lösung behandelt und 10 Minuten gekocht. Die Präparate wurden anschließend mit einer Phosphat-Salz-Pufferlösung (PBS, Phosphate Buffer Saline) mit Zusatz von 0,1% Triton X-100 und 0,3% Rinder-Serum-Albumin behandelt. Durch die Behandlung mit PBS wird eine bessere Haltbarkeit erreicht. Triton X-100 löst die Membranproteine AQP1 und AQP4 in ihrer nativen Konformation aus der Zellmembran. Rinder-Serum-Albumin verhindert unspezifische Antikörperbindung an der Membran und verringert so die Hintergrundsignale. Nach Inkubation wurde für 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Maushirn-Paraffinschnitte über Nacht bei 4°C mit anti-AQP1 (1:100), anti-AQP4 (1:200), anti-GFAP (1:400) und anti-NeuN (1:500) inkubiert, ausgewaschen und danach bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit Sekundärantikörpern behandelt (Molecular Probes®, Invitrogen™, 1:500). Die Infrarot-Immunfluoreszenz-Färbung wurde für AQP1, AQP4 und GFAP mit Kaninchen Sekundärantikörpern mit einer Wellenlänge von 680 nm (1:1000, Molecular Probes®, Invitrogen™) bzw. 800 nm (1:1000, Roche) durchgeführt. Mit Infrarot-Scanner (Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR, Biosciences, Deutschland) wurde das Fluoreszenz-Signal auf dem Maushirnschnitt lokalisiert und quantifiziert. Das Fluoreszenz-Signal bzw. die Immunreaktivität von AQP1 und AQP4 wurde jeweils im ipsi- und kontralateralen Kortex bestimmt.

2.5.3.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die klassische Fluorochrome-Methode mit konventionellem Einsatz der Epifluoreszenzmikroskopie wurden Alexa-Fluor-594 nm gekoppelte Kaninchen Sekundärantikörper (Molecular Probes®, Invitrogen™, 1:500) und Alexa-Fluor-468 nm gekoppelte Maus Sekundärantikörper (Molecular Probes®, Invitrogen™, 1:500) verwendet. Ziel war es, mit anti-AQP1, anti-AQP4, anti-GFAP und anti-NeuN, AQP1 und AQP4 in höherer Auflösung zu lokalisieren. Die Maushirn-Paraffinschnitte wurden mit Vectashield Medium (Vector laboratories, Burlingame, CA) und DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) behandelt. DAPI diente als Zellkernnachweis durch blau fluoreszierende Bindung an die DNA. Mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Olympus, Europa) wurde die Immunfluoreszenz in höherer Auflösung dargestellt und fotografisch dokumentiert.

2.5.3.3 Positiv- und Negativkontrolle

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Positiv- und Negativkontrollen hergestellt und einem Infrarot-Scan unterzogen. Um AQP1 und AQP4 zu lokalisieren, wurden die Präparate, wie unter 2.5.3.1 beschrieben, mit Primär- und rot fluoreszierenden Sekundärantikörpern behandelt. Als neuronaler Marker diente der grün fluoreszierende neuronenspezifische Marker NeuN (Neuronal Nuclei). Gliazellen wurden durch Fluoreszenzmarkiertes anti-GFAP (Glial fibrillary Acid Protein) nachgewiesen. Letzteres bindet an

zytoplasmatisches Intermediärfilament von Gliazellen. Der Zellkernnachweis wurde durch blau fluoreszierende Bindung an die DNA mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) erreicht. Zur Herstellung der immunhistochemischen Negativkontrolle wurde das Präparat nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Dadurch fehlten die Bindungsstellen für die Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, sodass kein Fluoreszenzsignal erwartet wurde. Die Negativkontrolle diente dem Ausschluss unspezifischer Bindung der Sekundärantikörper.

2.5.4 Experimentelle Gruppen

Für die Versuche wurden 8 Wochen alte C57/BL6 und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse verwendet. Die Hirnentnahme erfolgte von unbehandelten Tieren und 15 Minuten, 1, 3, 12 und 24 Stunden nach CCI mit einer maximalen Gruppengröße von n=5.

2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden computergestützt durchgeführt (SigmaStat 2.0, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland). Alle Daten werden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die maximale Gruppengröße betrug 11 Tiere, sodass für die statistische Analyse von nicht normalverteilten Daten ausgegangen wurde.

2.6.1 Neuroprotektive Effekte im V_{1a}-Rezeptor knock-out Modell

Für die statistische Auswertung des unverbundenen Gruppenvergleiches zu verschiedenen Zeitpunkten wurde zunächst die univariate Varianzanalyse (ANOVA on ranks), gefolgt vom Student-Newman-Keuls Test (SNK) als post-hoc-Analyse, verwendet (SigmaStat 2.0, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland). Follow-up Untersuchungen im zeitlichen Verlauf, wie die Untersuchung der physiologischen Parameter, die Gewichtsänderung und der Neuroscore, wurden durch zweifaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen (Two Way ANOVA for Repeated Measures), gefolgt vom SNK statistisch analysiert. Unterschiede zwischen den Stichproben wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ für die Ablehnung der Nullhypothese als signifikant betrachtet.

2.6.2 Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene

Der unverbundene Gruppenvergleich wurde statistisch mit univariater Varianzanalyse (ANOVA on ranks) ausgewertet. Zur Analyse der einzelnen Gruppen untereinander wurde ein Rangsummentest durchgeführt (Rank Sum Test, SigmaStat 2.0; Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland). Unterschiede zwischen den Stichproben wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ für die Ablehnung der Nullhypothese als signifikant betrachtet.

2.6.3 Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf Proteinebene

Für die statistische Auswertung wurde zunächst die univariate Varianzanalyse (ANOVA on ranks) gefolgt vom Dunn's Test eingesetzt (SigmaStat 2.0; Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland). Unterschiede zwischen den Stichproben wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ für die Ablehnung der Nullhypothese als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Neuroprotektive Effekte im V_{1a} -Rezeptor knock-out Modell

3.1.1 Physiologische Parameter

Die physiologischen Parameter mittlerer arterieller Druck (MAP), intrakranieller Druck (ICP) und zerebrale Durchblutung (CBF) waren bei den Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen 3 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI ohne signifikanten Unterschied. Der MAP und die kontralateral gemessene zerebrale Durchblutung fielen posttraumatisch in beiden Gruppen ab. Der ICP stieg posttraumatisch in beiden Gruppen an (Abbildung 11 bis Abbildung 13).

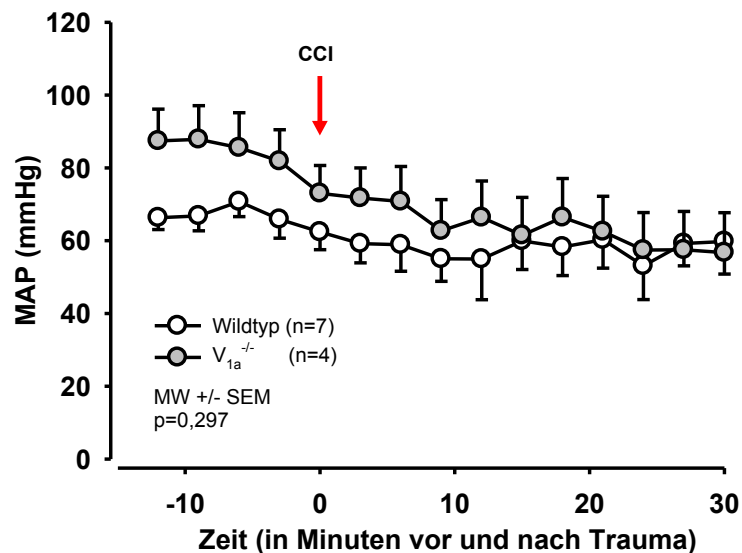


Abbildung 11: Mittlerer arterieller Druck (MAP)

Der MAP unterschied sich im zeitlichen Verlauf 10 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI nicht signifikant zwischen C57/BL6 und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen.

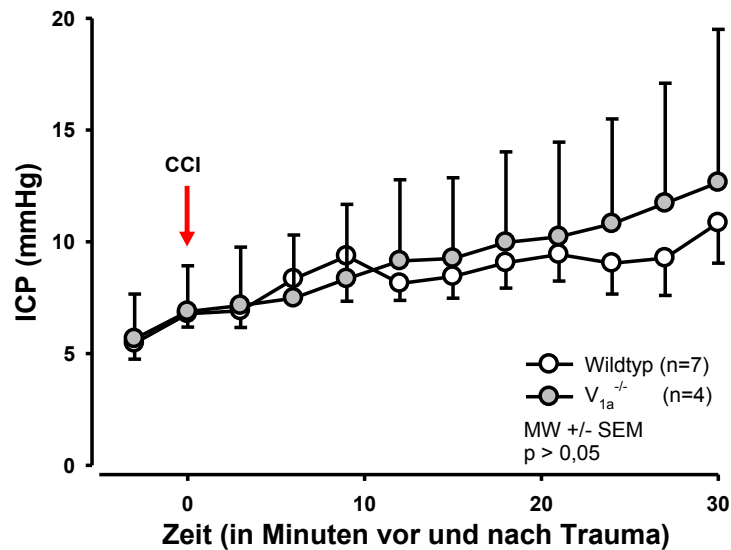


Abbildung 12: Intrakranieller Druck (ICP)

Der ICP unterschied sich im zeitlichen Verlauf 3 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI nicht signifikant zwischen C57/BL6 und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen.

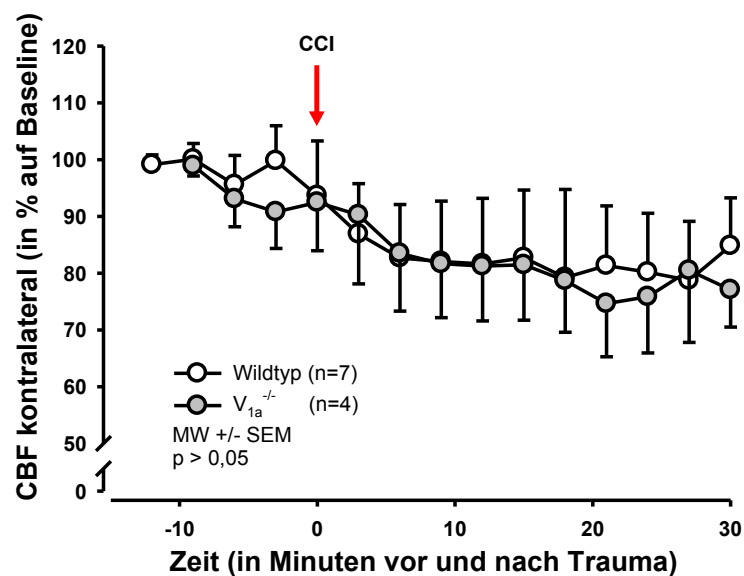


Abbildung 13: Zerebrale Durchblutung (CBF)

Die kontralateral gemessene, zerebrale Durchblutung unterschied sich im zeitlichen Verlauf 10 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI nicht signifikant zwischen den C57/BL6 und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen.

3.1.2 Hirnwassergehalt

Der Gesamthirnwassergehalt von unbehandelten Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen unterschied sich nicht und betrug $77,96 \pm 0,13\%$ bzw. $78,16 \pm 0,13\%$. 24 Stunden nach CCI stieg der Hirnwassergehalt in der traumatisierten Hemisphäre signifikant auf $80,56 \pm 0,24\%$ bei den Wildtyp Mäusen ($p < 0,001$) und $79,82 \pm 0,33\%$ bei den V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen ($p < 0,001$) im Vergleich zum Ausgangswert an. Dieser Anstieg des

Hirnwassergehaltes und damit die posttraumatische Hirnödembildung war bei den V_{1a} -Rezeptor-defizienten Mäusen signifikant um 29% gegenüber den Wildtyp Mäusen reduziert ($p=0.026$). In beiden Gruppen änderte sich der Hirnwassergehalt der kontralateralen Hemisphäre 24 Stunden nach CCI nicht (Abbildung 14).

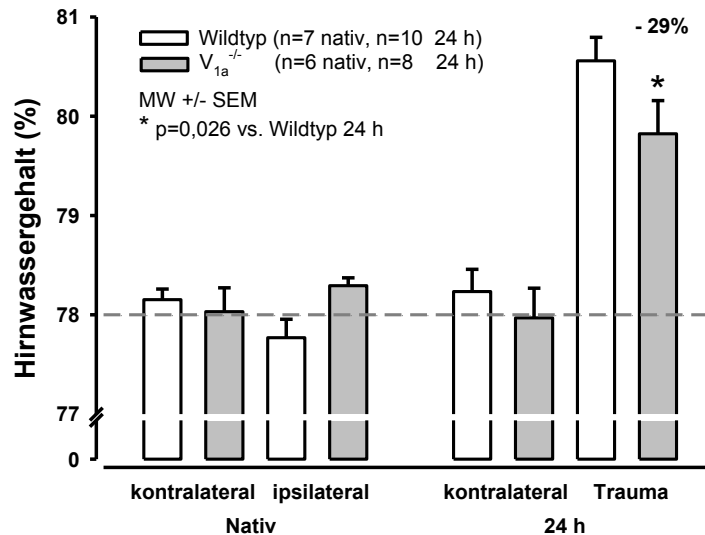


Abbildung 14: Hirnwassergehalt

Unbehandelte Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Hirnwassergehalt (*gestrichelte Linie*). 24 Stunden nach CCI stieg in beiden Gruppen der Hirnwassergehalt als Zeichen der Hirnödembildung in der traumatisierten Hemisphäre signifikant an. Diese posttraumatische Hirnödembildung war bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen um 29% signifikant gegenüber den Wildtyp Mäusen geringer ($p=0,026$).

3.1.3 Sekundäres Nekrosewachstum 24 Stunden und 7 Tage nach CCI

Das primäre Kontusionsvolumen unmittelbar nach dem Trauma betrug $21,14 \pm 0,63 \text{ mm}^3$. 24 Stunden nach CCI war das sekundäre Nekrosevolumen mit $45,12 \pm 1,54 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$) bei den Wildtyp Mäusen und $38,22 \pm 1,73 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$) bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen signifikant im Vergleich zur Primärkontusion erhöht. Das sekundäre Nekrosewachstum war bei den V_{1a} -Rezeptor-defizienten Mäusen um 29% gegenüber den Wildtyp Mäusen geringer ($p < 0,05$). Sieben Tage nach experimentellem Trauma war das sekundäre Nekrosevolumen sowohl bei den $V_{1a}^{-/-}$ Mäusen ($12,1 \pm 0,52 \text{ mm}^3$) als auch bei den Wildtyp Mäusen ($13,14 \pm 0,56 \text{ mm}^3$) reduziert (Abbildung 15).

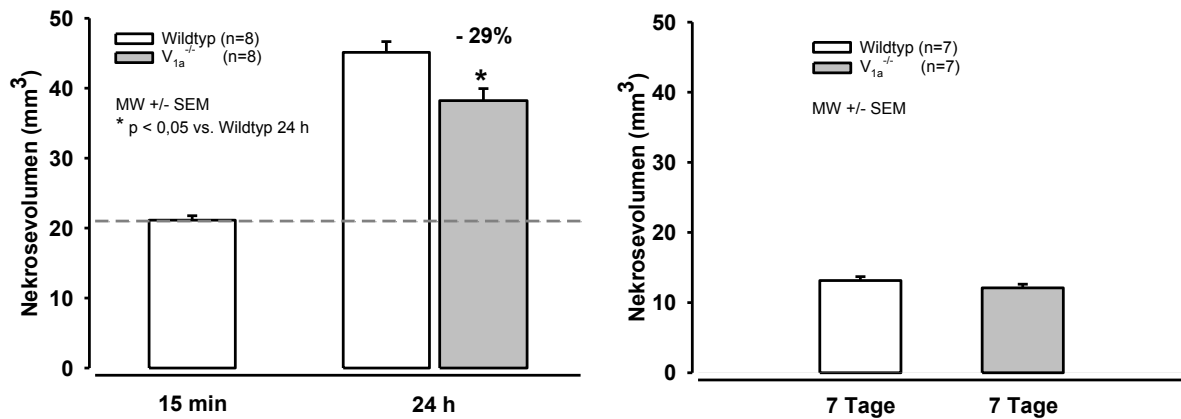


Abbildung 15: Sekundäres Nekrosewachstum

Das primäre Kontusionsvolumen wurde 15 Minuten nach CCI mit 21 mm³ ermittelt (*links und gestrichelte Linie*). 24 Stunden nach CCI war das sekundäre Nekrosewachstum bei den V_{1a}-Rezeptor knock-out gegenüber den Wildtyp Mäusen um 29% signifikant reduziert ($p < 0,05$). 7 Tage nach CCI war das Nekrosevolumen durch Schrumpfung und Abräumprozesse in beiden Gruppen deutlich reduziert und war daher nur eingeschränkt beurteilbar.

3.1.4 Gewichtsänderung

Das Ausgangsgewicht der Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse unterschied sich nicht. Beide Tiergruppen erlitten einen posttraumatischen Gewichtsverlust. Der Gewichtsverlust der V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse war an Tag 2, 3, 4, 5, und 6 Tag nach CCI signifikant geringer als bei den Wildtyp Mäusen ($p < 0,05$). V_{1a}-Rezeptor-defiziente Mäuse waren nur an Tag 1, 2 und 3 nach CCI signifikant leichter im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 ($p < 0,001$). Während sich die V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse bereits am vierten posttraumatischen Tag hinsichtlich ihres Gewichtsverlustes erholten, blieben die Wildtyp Mäuse bis zum geplanten Versuchsende an Tag 7 signifikant leichter im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht ($p=0,002$) (Abbildung 16).

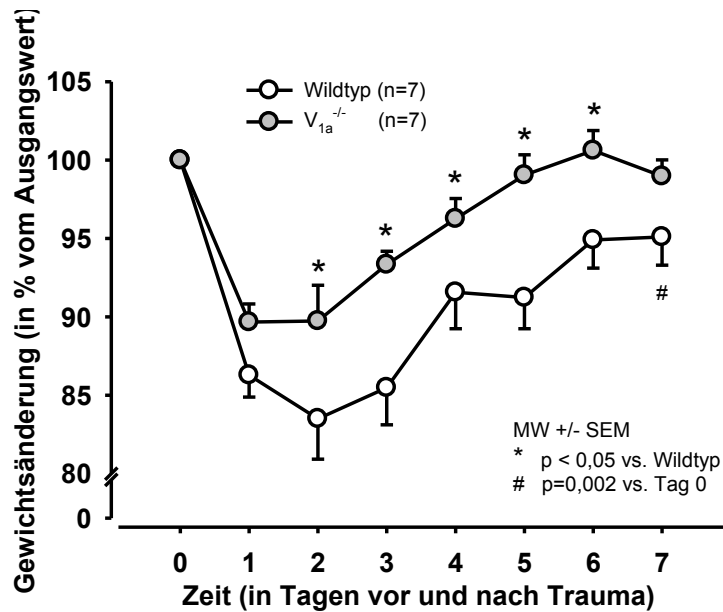


Abbildung 16: Gewichtsänderung als Parameter des Allgemeinzustandes

Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse hatten das gleiche Ausgangsgewicht. Die V_{1a}-Rezeptor Defizienz resultierte in einem signifikant geringeren Gewichtsverlust an Tag 2, 3, 4, 5 und 6 nach CCI ($p < 0,05$). Die V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse erholten sich bereits an Tag 4 hinsichtlich ihres Gewichtsverlustes von dem Trauma. Dagegen blieben die Wildtyp Mäuse bis zum geplanten Versuchsende an Tag 7 signifikant leichter im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht ($p=0,002$).

3.1.5 Neurologische Funktion

Die neurologische Funktion der Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse war mit einem initialen *Neurological Severity Score* (NSS) von 0 - 1.5 vor dem Trauma gleich. Die V_{1a}-Rezeptor-defizienten Mäuse zeigten über den posttraumatischen Beobachtungszeitraum von 7 Tagen einen signifikant besseren NSS ($3,2 \pm 0,8$) gegenüber den Wildtyp Mäusen ($7,0 \pm 1,4$) ($p < 0,005$). Die neurologische Funktion der V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse war an Tag 1 ($p=0,017$), Tag 2 ($p=0,004$), Tag 5, 6 und 7 ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen signifikant besser. 7 Tage nach CCI blieb die neurologische Funktion der Wildtyp Mäuse sowohl im Vergleich zu ihrem eigenen Ausgangswert ($p=0,002$) als auch im Vergleich zu den V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen ($p < 0,05$) signifikant schlechter. Dagegen hatten sich die V_{1a}^{-/-} Mäuse bereits an Tag 4 von ihrem Trauma erholt und zeigten keinen Unterschied in der neurologische Funktion im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung (Abbildung 17).

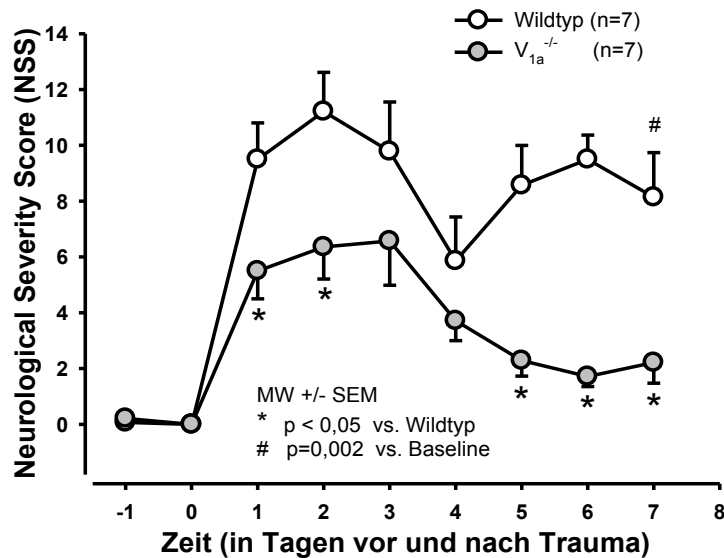


Abbildung 17: Neurologische Funktion

Die neurologische Funktion wurde mit dem *Neurological Severity Score* (NSS) von 0 bis 19 Punkten gemessen. 0 Punkte wurden für die beste, 19 Punkte für die schlechteste neurologische Funktion vergeben. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in ihrer Ausgangsfunktion. Wildtyp Mäuse hatten eine signifikant schlechtere neurologische Funktion an Tag 1, 2, 5, 6 und 7 nach CCI im Vergleich zu den V_{1a}-Rezeptor-defizienten Mäusen ($p < 0,05$). V_{1a}^{-/-} Mäuse erholten sich hinsichtlich ihrer neurologischen Funktion am 4. posttraumatischen Tag. Wildtyp Mäuse zeigten bis zum geplanten Versuchsende an Tag 7 einen signifikant schlechteren NSS sowohl gegenüber ihrem eigenen Ausgangswert ($p=0,002$) als auch gegenüber den V_{1a}-Rezeptor knock Mäusen ($p < 0,05$).

3.1.6 Mortalität

Alle Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse überlebten bis zum geplanten Versuchsende 7 Tage nach Controlled Cortical Impact.

3.2 Analytik

3.2.1 Nachweis spezifischer Primer-Hybridisierung für Aquaporin 1, 4 und 9

Die entwickelten AQP1, AQP4 und AQP9 Primer zeigten die erwarteten Banden mit einer Produktlänge von 222 Basenpaaren (bp) für AQP1, 144 bp für AQP4 und 194 bp für AQP9. Die Negativkontrolle wies jeweils keine Verunreinigung der Proben nach. Der Marker zeigte Banden im Abstand von je 100 bp mit intensivster Färbung bei einer Produktlänge von 500 bp (Abbildung 18, *links*). Der AQP1 Primer war spezifisch in Leber, Pankreas, Niere und Maushirn (C57/BL6). AQP4 und 9 wurden in Leber, Niere und Hirngewebe nachgewiesen. Die AQP4 und 9 Primer banden, mit Ausnahme von AQP4 im Lebergewebe, spezifisch. Die entwickelten AQP1, 4 und 9 Primer banden im Maushirn spezifisch (Abbildung 18).

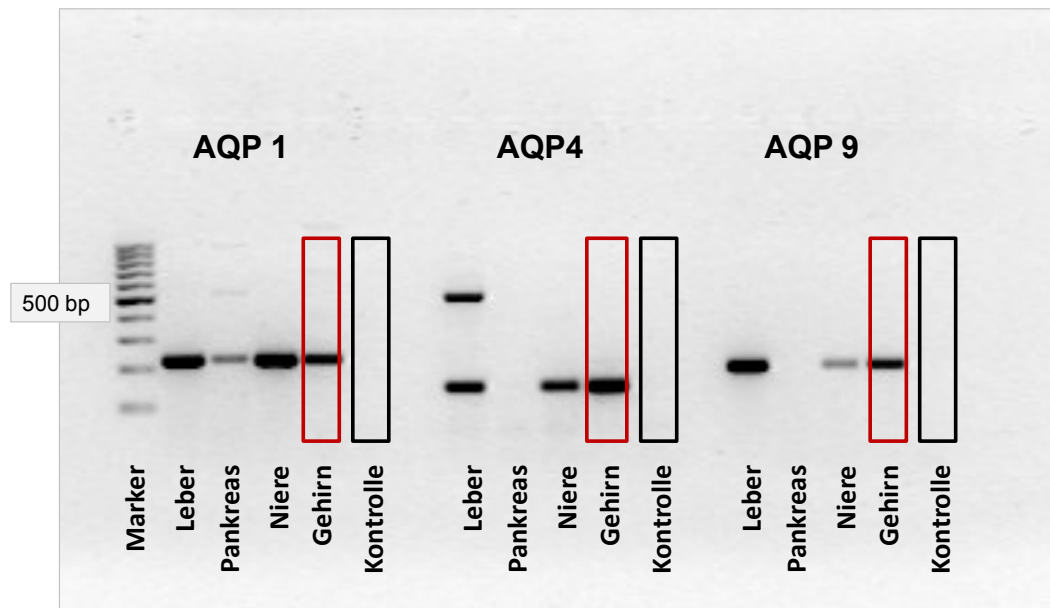


Abbildung 18: Nachweis der spezifischen Primer-Hybridisierung - Ergebnis der Gelelektrophorese

Die entwickelten AQP1, 4 und 9 Primer banden im Maushirn spezifisch. AQP1 wurde in Leber, Pankreas, Niere und Gehirn mit der erwarteten Produktlänge von 222 Basenpaaren (bp) nachgewiesen. AQP4 zeigte in Niere und Gehirn die erwartete Produktlänge von 144 bp. Der AQP4 Primer zeigte im Lebergewebe eine zweite Bande mit 500-600 bp und damit ca. 4-facher Länge. Grund dafür könnte eine erhöhte und unterschiedliche Enzymaktivität in der hochmetabolisch aktiven Leber, eine doppelte Primer Dimer Bildung oder die, in der elektronischen PCR theoretisch erwartete, jedoch dort nicht beobachtete Produktlänge von 580 bp sein. AQP9 war mit 194 bp in Leber, Niere und Gehirn spezifisch. Als Negativkontrolle wurde jeweils Wasser verwendet. Um die erwartete Produktlänge zu überprüfen, wurde ein Marker mit 100 bis 1.000 bp verwendet (*links*).

Der entwickelte AQP4 Primer zeigte nach elektronischer reversen PCR einen spezifischen Treffer mit einer Ziellänge von 144 bp. Zusätzlich wurde auch eine Produktlänge von 580 bp, jedoch ohne tatsächliches Produkt, theoretisch erwartet (Abbildung 19).

Mus musculus transcriptome					
nm-009700		Hits: 1			
Gene	obs.size		exp.size	L m/g	R m/g
Aqp4 (1 hit)	144	<	580	0/0	0/0
Legend		Times		Call parameters	
obs.size Observed size		Started 12/13/2008 12:12:37		margin: 1000	
exp.size Expected size		Finished 12/13/2008 12:12:40		mism: 2	
L m/g Left primer mismatches/gaps		Elapsed 3		gaps: 2	

Abbildung 19: Elektronische reverse PCR für AQP4 (Screenshot)

Für den entwickelten AQP4 Primer ergab die elektronische reverse PCR einen Treffer mit beobachteter Ziellänge von 144 bp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>). Die hier aufgeführte erwartete Produktlänge von 580 bp entspricht möglicherweise der gefundenen zweiten Bande im Lebergewebe (siehe Abbildung 18).

3.2.2 Aquaporin 1, 4 und 9 Primer – *Annealing* Temperatur

Für den AQP1 und 9 Primer war 57°C und für den AQP4 Primer 64°C die optimale *Annealing* Temperatur in der qualitativen PCR. Durch optimierte Schmelzkurvenanalyse wurden die *Annealing* Temperaturen für die quantitative Real-Time-PCR mit dem LightCycler® 1.5 (Firma Roche, Heidelberg, Deutschland) für die β -Aktin und AQP1 Primer bei 57°C belassen, für den AQP4 Primer auf 61°C und für den AQP9 Primer auf 59°C korrigiert.

3.3 Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene

3.3.1 Proteinspezifische Standardkurven und Standardkonzentrationen

Die optimale Standardkonzentrationen waren für β -Aktin 10^3 (Error: $e=0,0259$), für AQP1 10^5 ($e=0,00671$), für AQP4 10^5 ($e=0,0173$) und für AQP9 10^4 ($e=0,0361$). Wie bereits oben erwähnt, wurde ein Fehler $e < 0,2$ akzeptiert. In Abbildung 20 ist die AQP1 Standardkurve exemplarisch dargestellt.

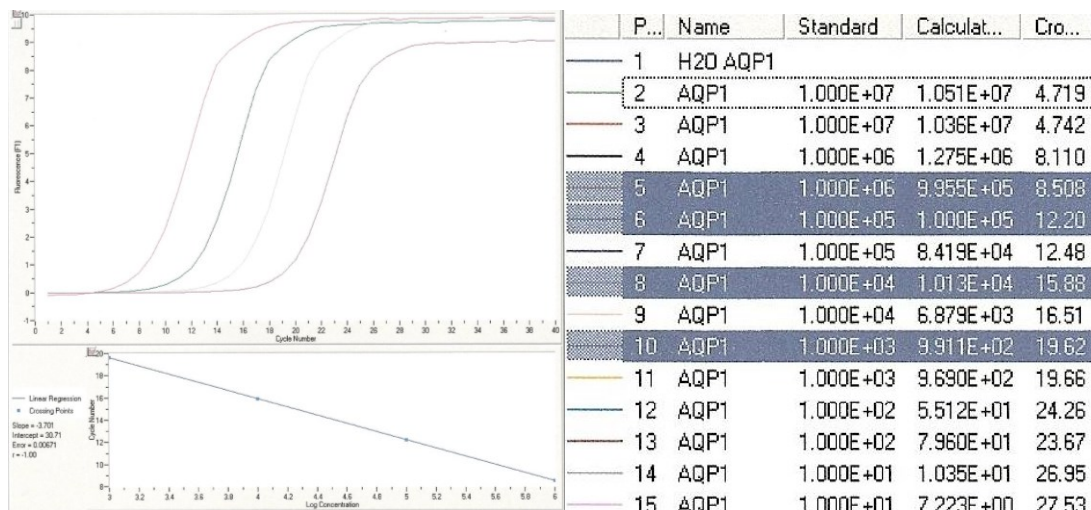


Abbildung 20: Standardkurve für AQP1

AQP1 Standardkurve mit parallelem Kurvenverlauf (*links oben*) und einem Fehler $e=0,00671$ (*links unten*) als Voraussetzung für die relative Quantifizierung der mRNA Expression. Für AQP1 wurde als Standard eine Verdünnung von 10^5 gewählt (*rechts*).

3.3.2 Housekeeping-Gen

Die β -Aktin mRNA Expression war bei den unbehandelten Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen sowie 24 Stunden nach CCI ohne signifikanten Unterschied ($p=0,298$). β -Aktin war daher in dem verwendeten Modell als Housekeeping-Gen geeignet.

3.3.3 Relative Quantifizierung – Korrektur auf das Housekeeping-Gen

Jede Zielgen cDNA Expression wurde auf β -Aktin als Housekeeping-Gen nach der Standardkurven-Methode, wie in Abschnitt 2.4.3 erläutert, korrigiert.

3.3.3.1 Aquaporin 1

Die AQP1 mRNA Expression unterschied sich nicht zwischen den unbehandelten Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen. Die AQP1 mRNA Expression war 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact bei den Wildtyp Mäusen signifikant auf das Vierfache hochreguliert ($p=0,031$). Dieser Effekt wurde durch den V_{1a} -Rezeptor knock-out unterdrückt (Abbildung 21).

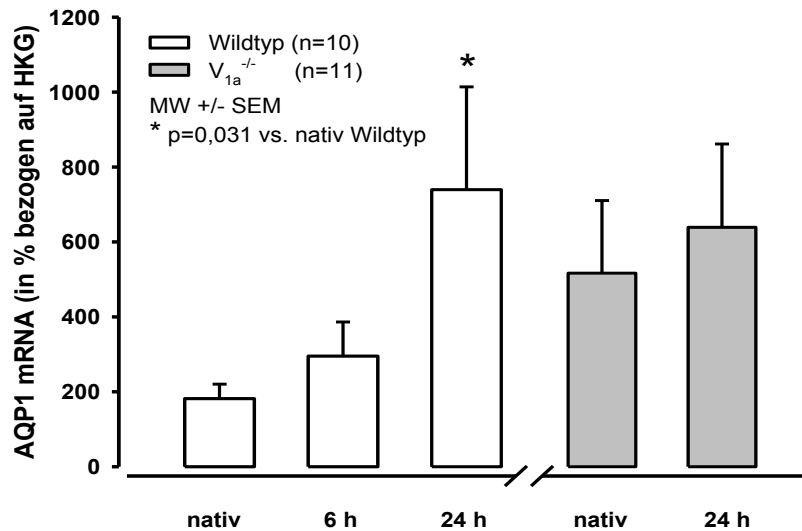


Abbildung 21: AQP1 mRNA Expression bei Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen

Unbehandelte Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in ihrer AQP1 mRNA Expression. 24 Stunden nach CCI war die AQP1 mRNA Expression auf die vierfache Menge bei den Wildtyp Mäusen hochreguliert ($p=0,031$). Die genetische Deletion des V_{1a} -Rezeptors unterdrückte diesen Effekt.

3.3.3.2 Aquaporin 4

Unbehandelte Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in ihrem AQP4 mRNA Gehalt. AQP4 wurde im zeitlichen Verlauf über 6 und 24 Stunden nach CCI im Wildtyp auf mRNA Ebene nicht reguliert. 24 Stunden nach CCI war die AQP4 mRNA Expression bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen signifikant niedriger im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp Mäusen ($p=0,022$) (Abbildung 22).

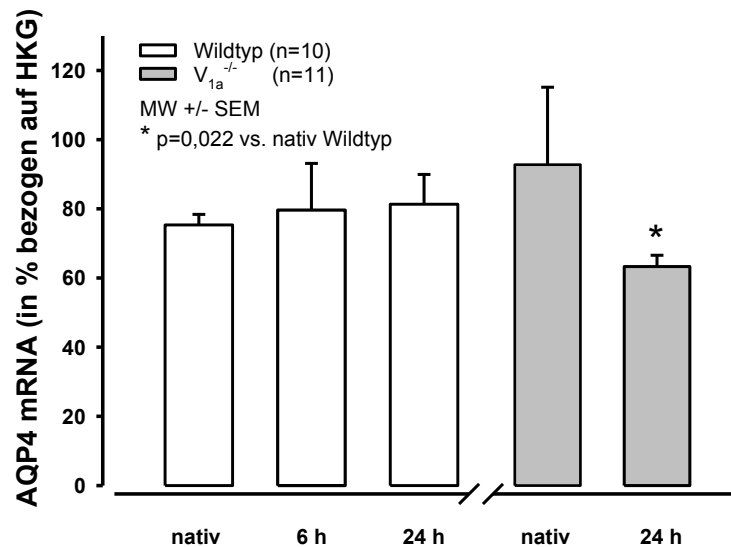


Abbildung 22: AQP4 mRNA bei Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen

AQP4 mRNA wird im posttraumatischen Verlauf 6 und 24 Stunden nach CCI konstitutiv im Wildtyp exprimiert. Die AQP4 mRNA wurde 24 Stunden nach CCI V_{1a} -Rezeptor-abhängig im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp Mäusen runterreguliert ($p=0,022$).

3.3.3.3 Aquaporin 9

Unbehandelte Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in ihrer AQP9 mRNA Expression. Die AQP9 mRNA wurde bis 24 Stunden nach CCI sowohl bei den Wildtyp als auch bei den $V_{1a}^{-/-}$ knock-out Mäusen nicht reguliert (Abbildung 23).

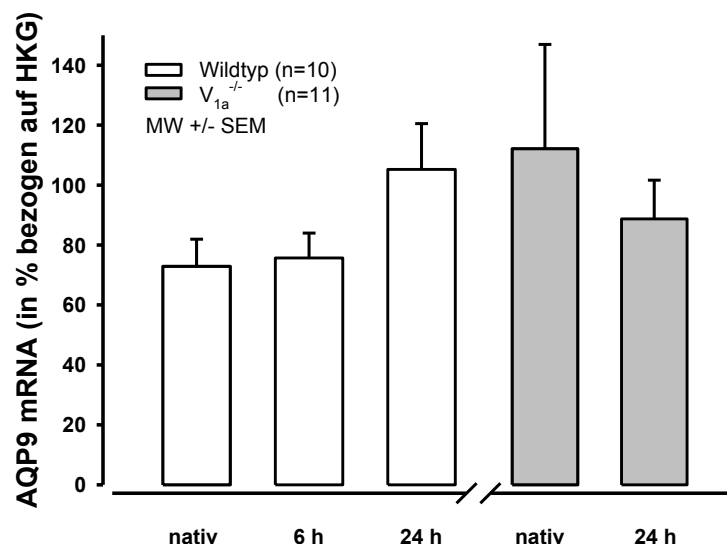


Abbildung 23: AQP9 mRNA bei Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen

Unbehandelte Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse unterschieden sich nicht in ihrer AQP9 mRNA Expression. 24 Stunden nach CCI war die AQP9 mRNA Expression in beiden Tiergruppen ohne signifikanten Unterschied.

3.4 Lokalisation und Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene

3.4.1 Immunhistochemische Analyse – Lokalisation von AQP1 und AQP4

3.4.1.1 Positiv- und Negativkontrolle

Mit dem Infrarot-Scan wurde in niedriger Auflösung das unterschiedliche Expressionsmuster von AQP1 und AQP4 im gesunden, nicht-traumatisierten Maushirn nachgewiesen. AQP1 wurde nicht nur auf dem Epithel des Plexus choroideus, sondern auch weit verbreitet auf Neuronen des Kortex, Hippocampus sowie auf neuronalen Fasersystemen, wie die Co-Lokalisation mit dem neuronalen Marker, NeuN, verdeutlicht, exprimiert (Abbildung 24).

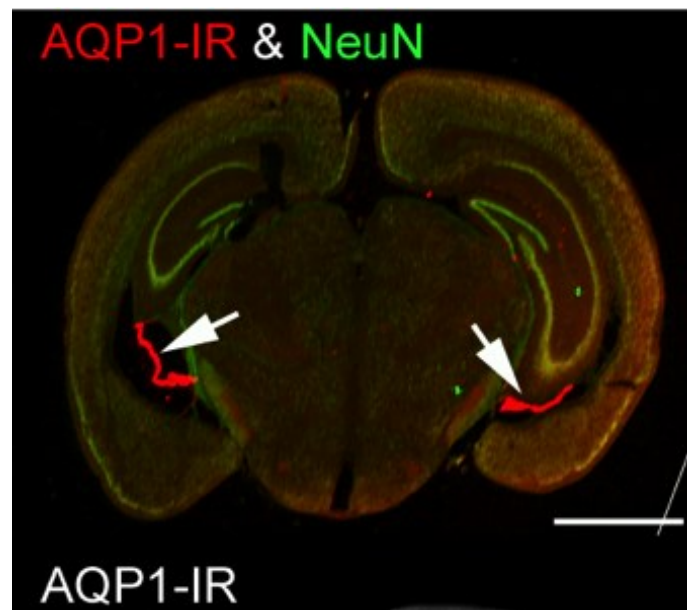


Abbildung 24: AQP1 Expression im gesunden Maushirn - niedrige Auflösung (Positivkontrolle)

AQP1 (*rot fluoreszierend*) wird nicht nur auf dem Epithel des Plexus choroideus (*weiße Pfeile*), sondern auch weit verbreitet auf Neuronen des Kortex, Hippocampus sowie entlang neuronaler Fasersysteme exprimiert (AQP1-IR, Immunreaktivität). Die Expression auf Neuronen wird durch die Co-Lokalisation mit dem neuronalen Marker, NeuN (*grün fluoreszierend*), sichtbar.

AQP4 wurde kortikal und subkortikal auf Gliazellen nachgewiesen. Im Gegensatz zu AQP1 wurde AQP4 nicht auf Neuronen nachgewiesen, wie die streng getrennte Expression von dem neuronalen Marker, NeuN, zeigt. AQP4 war weit verbreitet auf der Kortexoberfläche, im Bereich der Meningen, im Plexus choroideus, im Stratum radiatum des Hippocampus sowie subkortikal in der weißen Substanz lokalisiert (Abbildung 25).

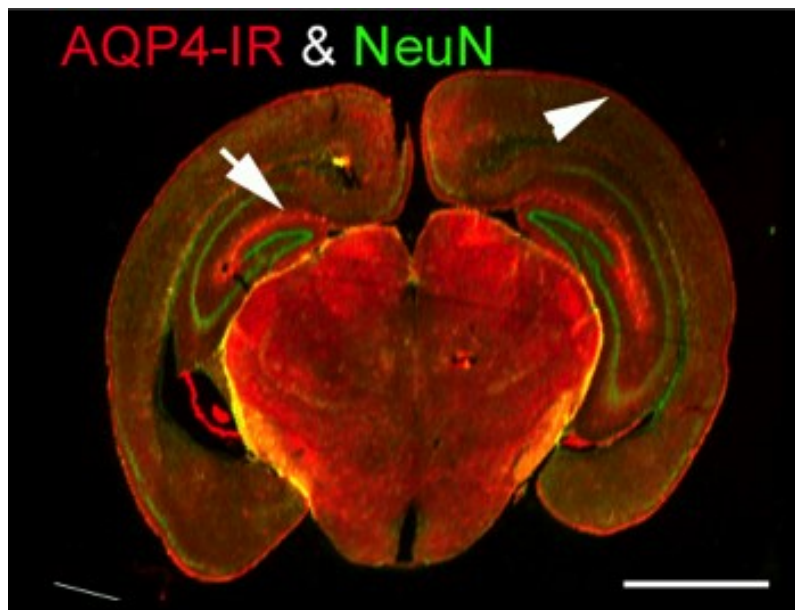


Abbildung 25: AQP4 Expression im gesunden Maushirn - niedrige Auflösung (Positivkontrolle)

AQP4 (*rot fluoreszierend*) wird kortikal und subkortikal auf Gliazellen exprimiert, wie die Rotfluoreszenz streng getrennt von dem neuronalen Marker, NeuN (*grün fluoreszierend*), zeigt. AQP4 wurde auf der Kortexoberfläche entlang der Meningen (*weiße Pfeilspitze*), dem Plexus choroideus, im Stratum radiatum des Hippocampus (*weißer Pfeil*) sowie subkortikal nachgewiesen (AQP4-IR, Immunreaktivität).

Die immunhistochemische Negativkontrolle ergab keinen Hinweis auf unspezifische Bindung durch den verwendeten Sekundärantikörper (Abbildung 26).

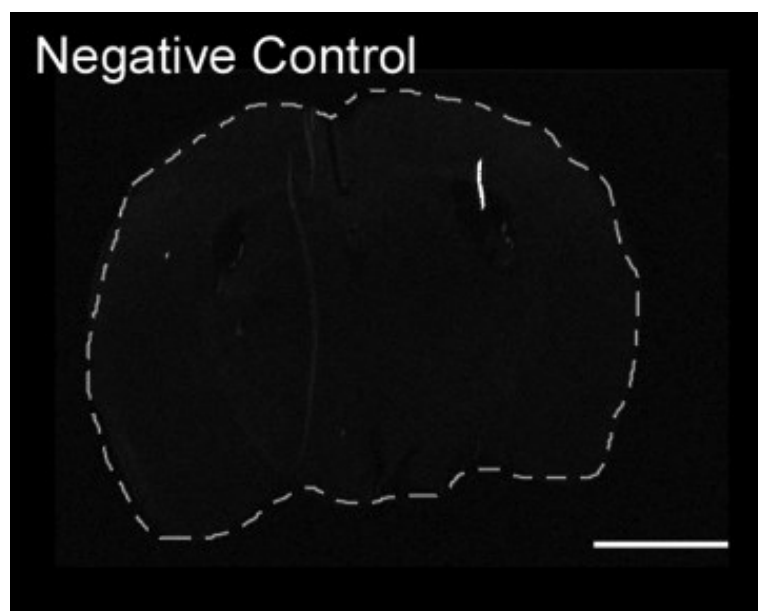


Abbildung 26: Immunhistochemische Negativkontrolle

Die Negativkontrolle konnte unspezifische Bindungen der verwendeten Sekundärantikörper durch fehlendes Fluoreszenzsignal ausschließen. Das unbehandelte Maushirnpräparat wurde nicht mit Primärantikörpern behandelt, so dass den Sekundärantikörpern ihre Bindungsstellen fehlten.

3.4.1.2 Lokalisation von AQP1 und AQP4 im gesunden Maushirn

Mit der Epifluoreszenzmikroskopie und Fluorochrome-Methode wurde AQP1 und 4 in höherer Auflösung nachgewiesen. Im gesunden Wildtyp Maushirngewebe wurde AQP1 auf kortikalen Neuronen und AQP4 auf Astrozyten nachgewiesen (Abbildung 27).

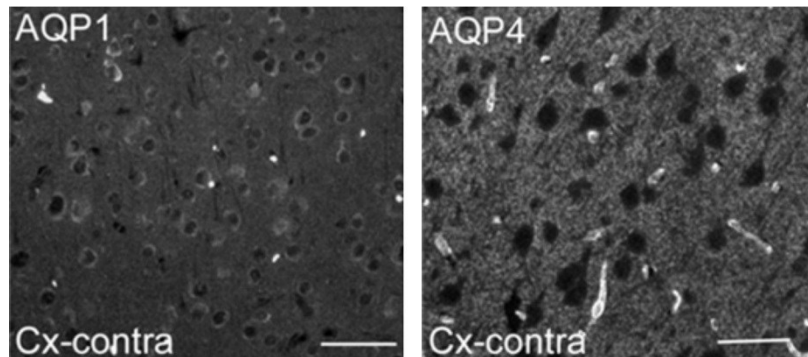


Abbildung 27: AQP1 und AQP4 Expression im gesunden Maushirngewebe - hohe Auflösung

Im gesunden Wildtyp Maushirngewebe wurde AQP1 auf kortikalen Neuronen (*links*) und AQP4 auf Astrozyten (*rechts*) nachgewiesen.

3.4.1.3 Posttraumatische AQP1 und AQP4 Expression im Wildtyp

Nach CCI wurde AQP1 auch auf kortikalen Neuronen (Abbildung 28) und AQP4 auch auf Astrozyten im Wildtyp nachgewiesen (Abbildung 29).

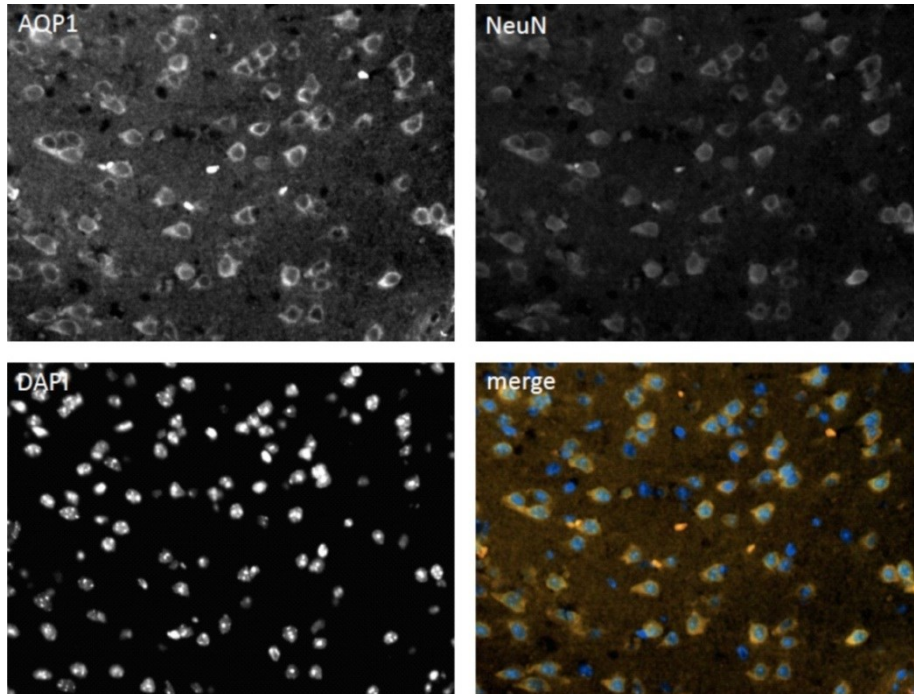


Abbildung 28: Posttraumatische AQP1 Expression im Wildtyp Maushirn - hohe Auflösung

Posttraumatisch wurde AQP1 (*Mischfarbe Gelb*) auch auf kortikalen Neuronen im Wildtyp exprimiert, wie die Co-Lokalisation von AQP1, NeuN und DAPI positiven Zellen, letztere blau fluoreszierend, zeigt (*merge, rechts unten*).

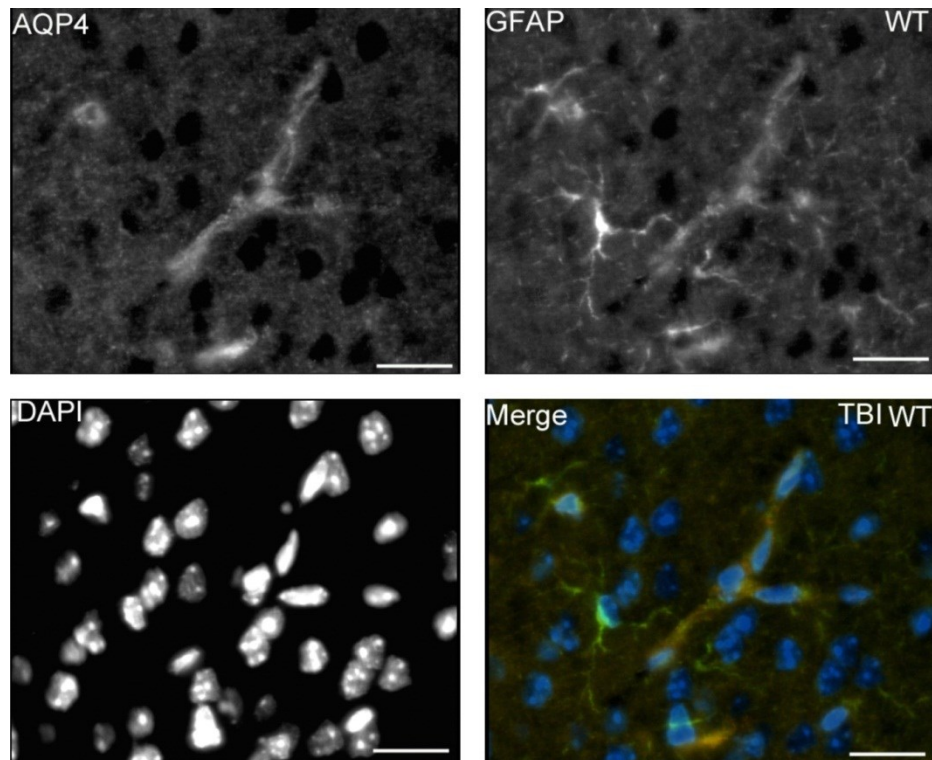


Abbildung 29: Posttraumatische AQP4 Expression im Wildtyp Maushirn - hohe Auflösung

Posttraumatisch wurde AQP4 (*Mischfarbe Gelb*) auch auf Astrozyten im Wildtyp exprimiert, wie die Co-Lokalisation von AQP4 mit GFAP positiven Zellen in der Dreifachfärbung verdeutlicht (*merge, rechts unten*).

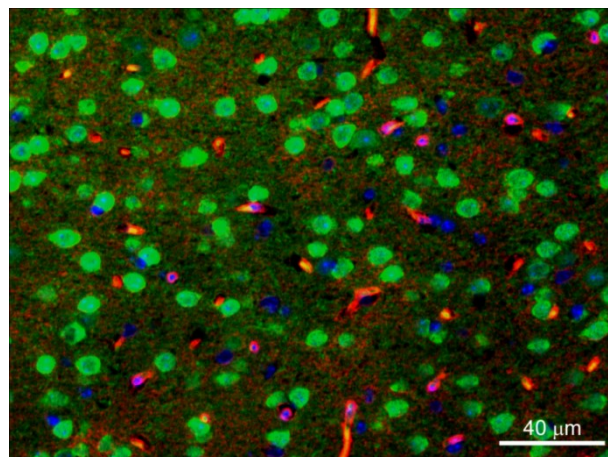


Abbildung 30: AQP4 (rot) Expression im traumatisierten Kortex von Wildtyp Mäusen

AQP1 Expression im zeitlichen Verlauf nach CCI im Wildtyp

AQP1 positive Zellen wurden sowohl im ipsi- als auch kontralateralen Kortex auf Neuronen von Wildtyp Mäusen nachgewiesen. 15 Minuten nach CCI stieg die AQP1 Expression in beiden Hemisphären gegenüber unbehandelten Tieren signifikant auf das Dreifache an ($p < 0,05$). 24 Stunden nach CCI blieb die AQP1 Expression im kontralateralen Kortex unverändert erhöht ($p < 0,05$), während AQP1 im traumatisierten Kortex nahezu wieder den Ausgangswert erreichte (Abbildung 31 und Abbildung 32).

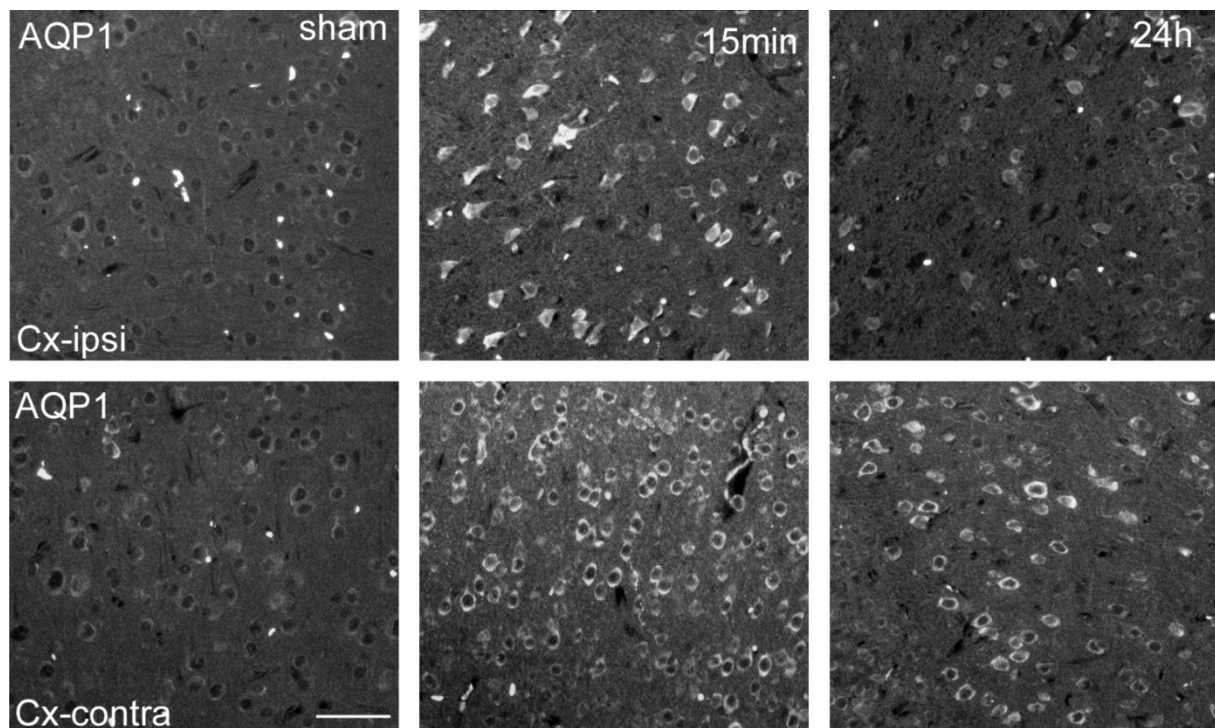


Abbildung 31: AQP1 Expression im Wildtyp

AQP1 positive Neurone im ipsi- und kontralateralen Kortex von Wildtyp Mäusen. Untersucht wurden nicht traumatisierte Hirne (*links*) und der zeitliche Verlauf 15 Minuten (*Mitte*) und 24 Stunden nach CCI (*rechts*).

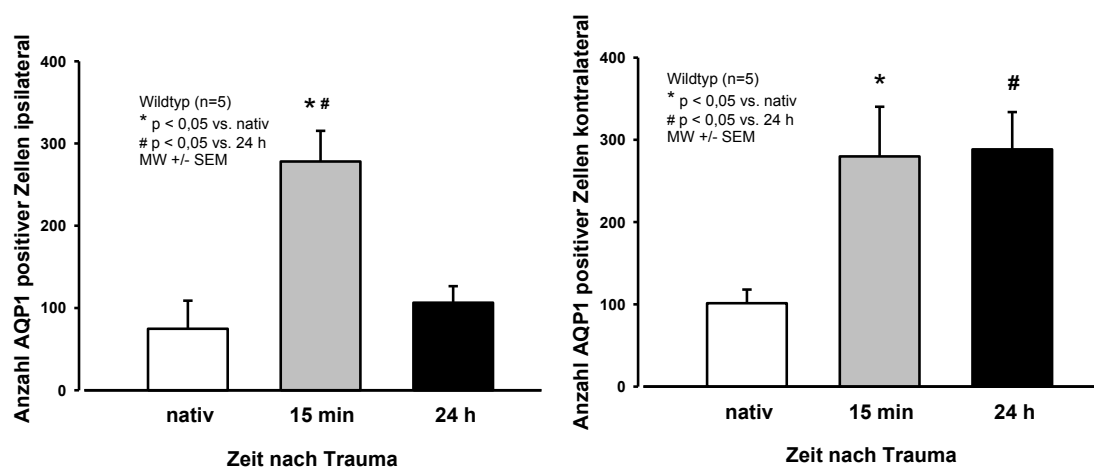


Abbildung 32: Quantifizierung AQP1 positiver Zellen im Wildtyp

AQP1 wurde 15 Minuten nach CCI in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre von Wildtyp Mäusen auf das ca. Dreifache hochreguliert ($p < 0,05$). 24 Stunden nach CCI entsprach die Anzahl der AQP1 positiven Neurone in der traumatisierten Hemisphäre wieder annähernd dem Ausgangsniveau. Dagegen blieb die AQP1 Expression in der kontralateralen Hemisphäre weiterhin dreifach erhöht ($p < 0,05$).

AQP4 Expression im zeitlichen Verlauf nach CCI im Wildtyp

AQP4 positive perivaskuläre Astrozyten wurden sowohl im ipsi- als auch kontralateralen Kortex von Wildtyp Mäusen nachgewiesen. Das Expressionsmuster der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre änderte sich vor und im zeitlichen Verlauf 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI nicht (Abbildung 33).

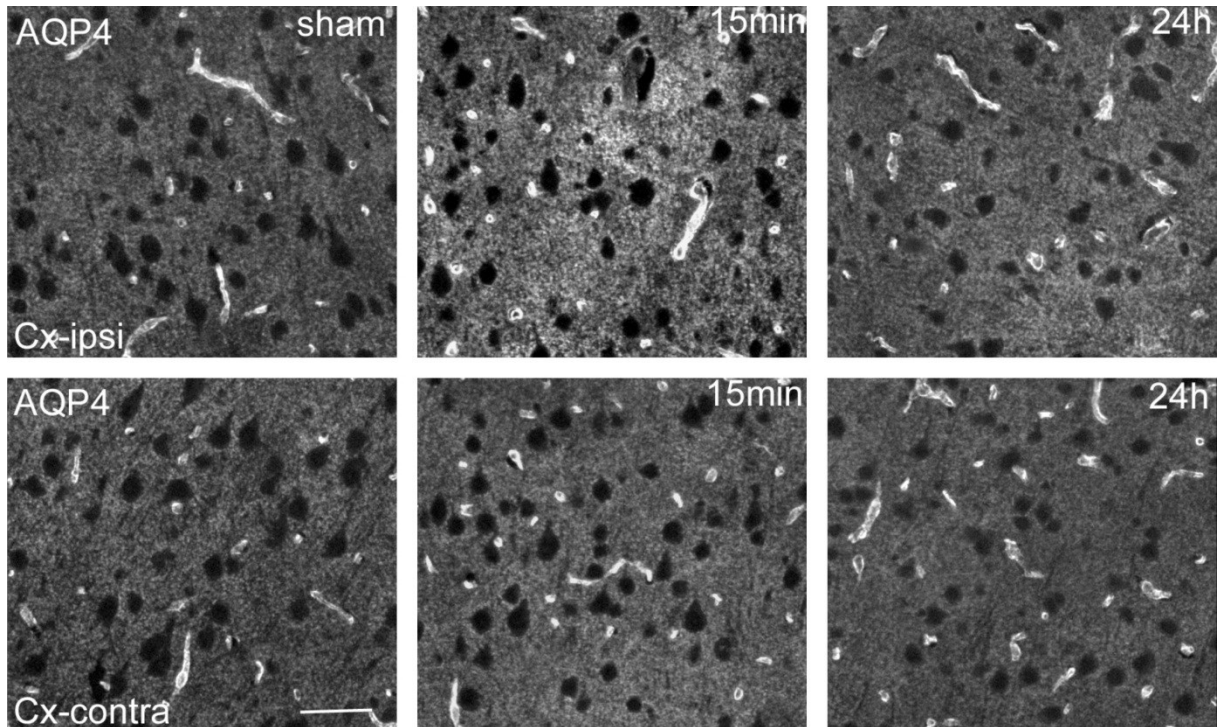


Abbildung 33: AQP4 Expression im Wildtyp

AQP4 wurde auf perivaskulären Astrozyten Endfüßchen in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre von Wildtyp Mäusen nachgewiesen. Die Expression von AQP4 in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre änderte sich im Vergleich zum Ausgangsniveau 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI nicht.

3.4.1.4 Posttraumatische AQP1 Lokalisation im Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out

Eine Stunde nach CCI war eine höhere AQP1 Expression auf kortikalen Neuronen von Wildtyp im Vergleich zu V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen nachweisbar. Der neuronale Marker NeuN blieb in beiden Gruppen unverändert (Abbildung 34).

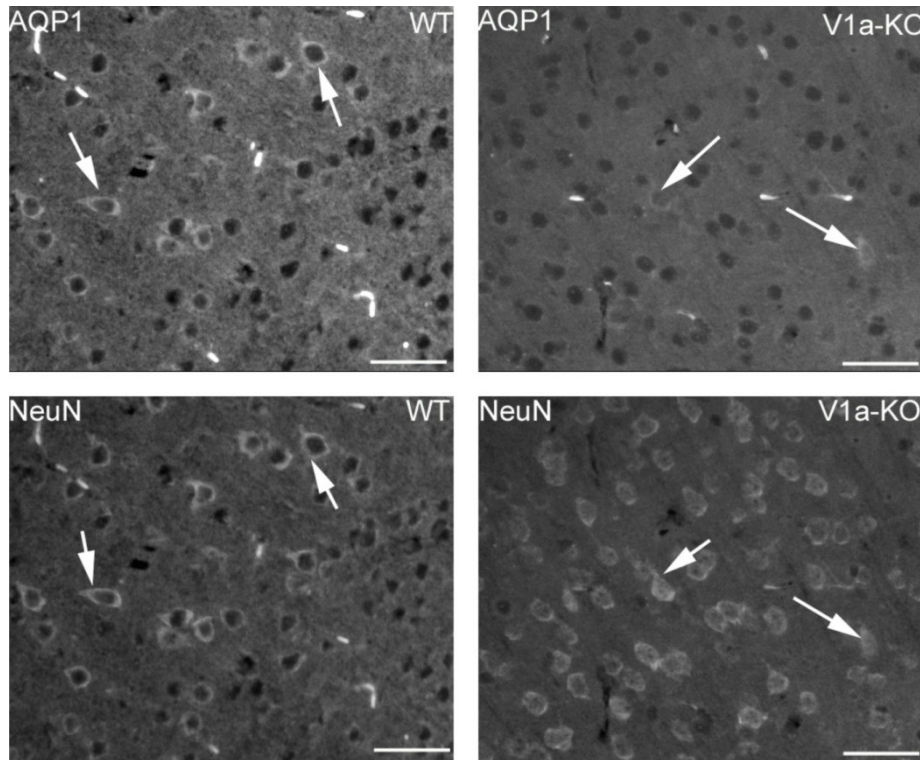


Abbildung 34: Posttraumatische AQP1 Expression auf kortikalen Neuronen in Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen

Die V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse (*rechts oben*) zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (*links oben*) eine reduzierte AQP1 Expression eine Stunde nach CCI. NeuN positive Zellen waren in beiden Gruppen unverändert (*unten*).

3.4.1.5 Posttraumatische AQP4 Lokalisation im Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out

Eine Stunde nach CCI war eine höhere AQP4 Expression auf perivaskulären Astrozyten Endfüßchen von Wildtyp im Vergleich zu den V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen nachweisbar. Die Kontrollfärbung GFAP blieb in beiden Tiergruppen unverändert (Abbildung 35).

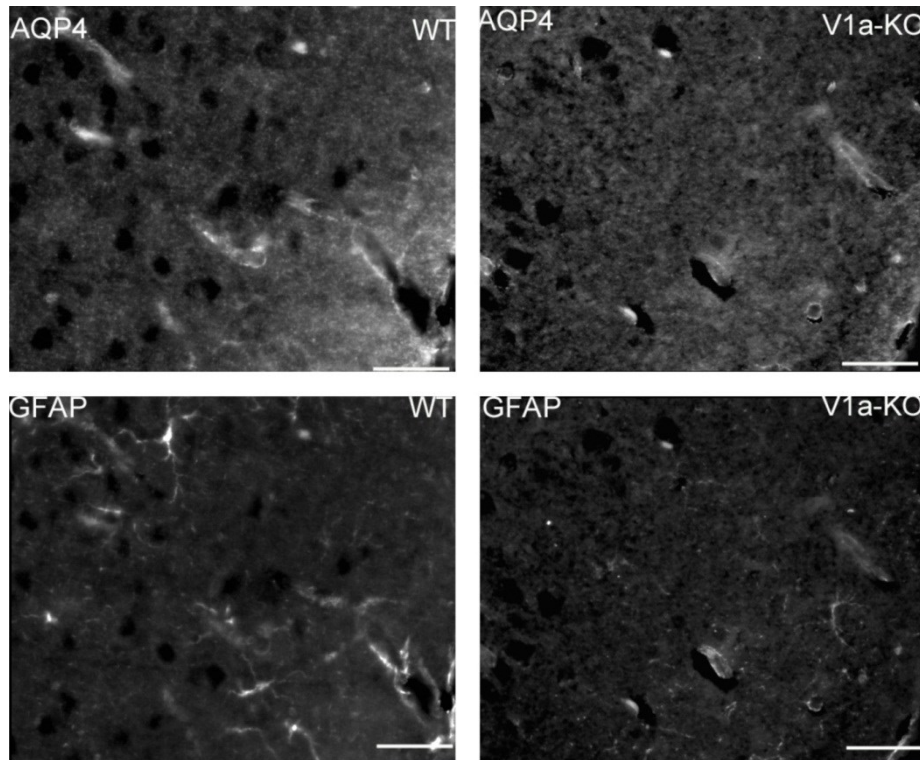


Abbildung 35: Posttraumatische AQP4 Expression auf perivaskulären Astrozyten Endfüßchen in Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäusen

Die V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse (*rechts oben*) zeigten im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (*links oben*) eine reduzierte AQP4 Expression eine Stunde nach CCI. GFAP positive Zellen waren in beiden Gruppen unverändert (*unten*).

3.4.2 Quantifizierung von AQP1 im Wildtyp und V_{1a}-Rezeptor knock-out

Die periläsionale und posttraumatische Quantifizierung von AQP1 war aufgrund der posttraumatischen Blutung (Abbildung 36) und der AQP1 Expression auf Erythrozyten nicht valide. Daher wurde AQP1 nur in der kontralateralen Hemisphäre quantifiziert.

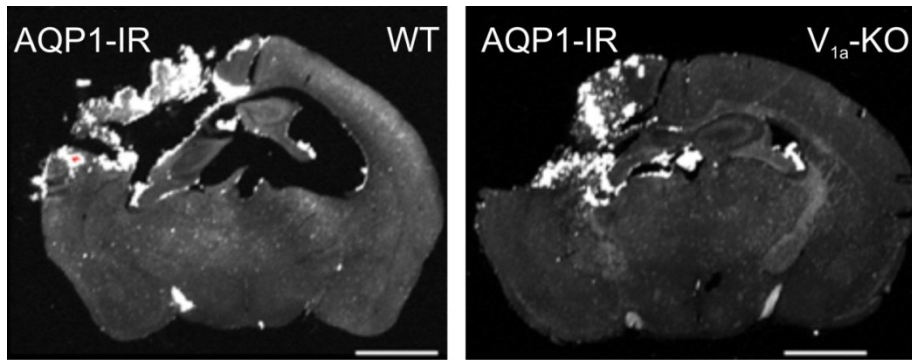


Abbildung 36: Koronare Maushirnppräparate von Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen

Die perilesionale Blutung führte zu einer ausgeprägten perilesionalen AQP1 Immunreaktivität, da AQP1 auch auf Erythrozyten exprimiert wird. Eine valide zerebrale AQP1 Quantifizierung war daher nur in der kontralateralen Hemisphäre möglich.

AQP1 wurde eine und 24 Stunden nach CCI in der kontralateralen Hemisphäre in den Wildtyp Mäusen hochreguliert. Diese Regulation war bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen bis 24 Stunden nach CCI nicht nachweisbar und somit V_{1a} -Rezeptor-abhängig. Beide Tiergruppen unterschieden sich signifikant bezüglich der AQP1 Expression über den untersuchten Zeitraum 1, 3, 12 und 24 Stunden nach CCI ($p=0,008$). Darüber hinaus konnte eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige Kurzzeit-Hochregulation von AQP1 eine Stunde nach CCI in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden ($p=0,019$) (Abbildung 37).

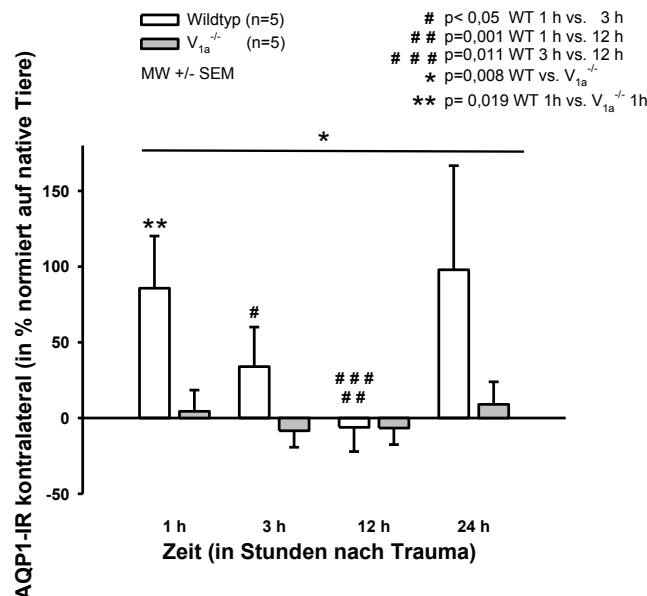


Abbildung 37: AQP1 Expression in Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen (kontralateral)

AQP1 wurde eine und 24 Stunden nach CCI in der kontralateralen Hemisphäre von Wildtyp Mäusen hochreguliert. Diese Hochregulation war bei den $V_{1a}^{-/-}$ Mäusen bis 24 Stunden nach CCI nicht nachweisbar und somit V_{1a} -Rezeptor-abhängig. Beide Tiergruppen unterschieden sich signifikant bezüglich der AQP1 Expression über den untersuchten Zeitraum 1, 3, 12 und 24 Stunden nach CCI ($p=0,008$). Darüber hinaus konnte eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige Kurzzeit-Hochregulation von AQP1 eine Stunde nach CCI in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden ($p=0,019$).

3.4.3 Quantifizierung von AQP4 im Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out

In der traumatisierten Hemisphäre von Wildtyp Mäusen war die AQP4 Expression 1, 3 und 12 Stunden nach CCI erhöht. Diese Regulation war in den V_{1a} -Rezeptor knock-out Präparaten nicht nachweisbar. AQP4 war eine Stunde nach CCI in der traumatisierten Hemisphäre von Wildtyp Mäusen stärker als von V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen exprimiert ($p=0,036$). 24 Stunden nach CCI war AQP4 in der traumatisierten Hemisphäre von Wildtyp Mäusen signifikant geringer als eine Stunde nach dem Trauma nachzuweisen ($p=0,008$) (Abbildung 38, *links*).

Kontralateral zum Trauma war die AQP4 Expression 1, 3 und 24 h nach CCI im Wildtyp im Vergleich zum Ausgangswert um ca. 25% erhöht. Diese Änderung war jedoch nicht signifikant. Bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen änderte sich die AQP4 Expression 1, 3 und 24 Stunden nach CCI dagegen nicht. 12 Stunden nach CCI war die AQP4 Expression kontralateral zum Trauma in beiden Tiergruppen, also V_{1a} -Rezeptor unabhängig, um ca. 25% reduziert (Abbildung 38, *rechts*).

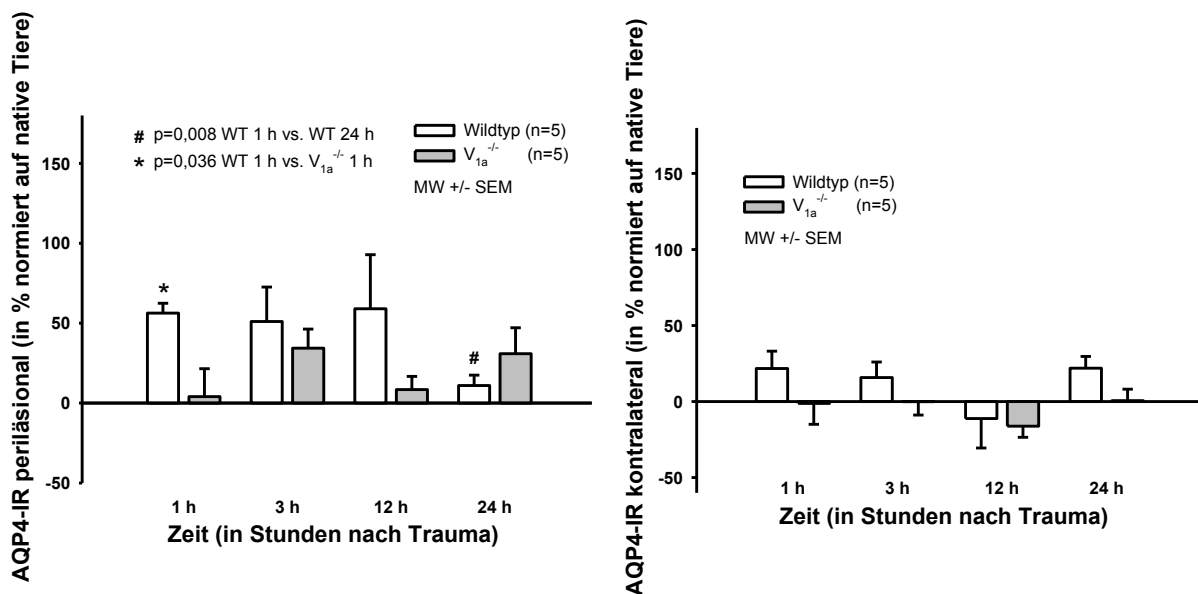


Abbildung 38: AQP4 Expression in Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen

AQP4 wurde perilesional (*links*) 1, 3 und 12 Stunden nach CCI im Wildtyp hochreguliert. Eine Stunde nach CCI war die erhöhte AQP4 Expression V_{1a} -Rezeptor-abhängig ($p=0,036$). 24 Stunden nach CCI war AQP4 in der traumatisierten Hemisphäre von Wildtyp Mäusen signifikant geringer als eine Stunde nach dem Trauma nachzuweisen ($p=0,008$). Kontralateral zum Trauma wurde AQP4 um ca. 25% nur in den Wildtyp Mäusen 1, 3 und 24 Stunden nach CCI hochreguliert. Dieser Effekt war V_{1a} -Rezeptor vermittelt.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Auswahl des experimentellen Trauma-Modells

Die Untersuchung der Pathomechanismen von Schädel-Hirnverletzungen erfordert ein experimentelles Tiermodell, das die klinisch-morphologischen und -funktionellen Verletzungsfolgen möglichst genau widerspiegelt (Lighthall et al., 1989). Aufgrund der Heterogenität der Verletzungsmuster ist es nahezu unmöglich, sämtliche Mechanismen in einem experimentellen Modell abzubilden. Alle bestehenden Tiermodelle vereinfachen den Mechanismus des akzidentellen Schädel-Hirntraumas. Insbesondere wird der Coup und Contre-Coup, bereits 1896 von Allen beschrieben, und typisch nach Sturz oder Verkehrsunfall durch Akzeleration-Dezeleration, nicht ausreichend experimentell abgebildet (Allen, 1896; Denny-Brown und Russell, 1941; Goggio, 1941).

Erstmals wurde 1941 ein experimentelles *Cerebral Concussion* Modell an Primaten beschrieben (Denny-Brown und Russell, 1941). Seitdem wurden das *Fluid Percussion* (Dixon et al., 1987), das *Weight-drop* Modell (Marmarou et al., 1994) und das *Controlled Cortical Impact* (CCI) (Lighthall, 1988) an Ratten entwickelt. 1995 wurde durch Smith et al. das CCI an Mäusen etabliert (Smith et al., 1995). Für Untersuchungen an genetisch veränderten Tieren war aktuell ein experimentelles Mausmodell erforderlich, so dass das CCI für die Untersuchungen gewählt wurde. Das CCI ist ein gut etabliertes, validiertes, reproduzierbares und breit angewendetes Kontusionsmodell. Es schien geeignet, da es sowohl ein zytotoxisches als auch vasogenes Hirnödem auslöst und damit die klinische, posttraumatische Situation widerspiegelt (Unterberg et al., 1997; Hannay et al., 1999; Unterberg et al., 2004; Albert-Weissenberger und Siren, 2010). Sowohl das *Fluid Percussion Injury* Modell (FPI) (Carbonell et al., 1998), das Kälteläsionsmodell (Raslan et al., 2012) als auch das *Weight-drop* Modell wurden mittlerweile an Mäusen etabliert (Flierl et al., 2009). Nachteil des FPI Modells ist die kombinierte, je nach Lokalisation auch bilaterale, Hirnschädigung mit hoher, Apnoe induzierter, Mortalitätsrate. Das Kälteläsionsmodell löst eine fokale Läsion mit Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke aus und induziert ein vasogenes Hirnödem. Nach Schädel-Hirnverletzungen entsteht jedoch sowohl ein vasogenes als auch zytotoxisches Hirnödem, so dass daher das Kälteläsionsmodell ebenfalls für die Fragestellung unterlegen war. Das *Weight-drop* Modell führt zu einem diffusen Axonschaden. Der diffuse Axonschaden ist zwar u.a. wesentlich für die klinische Langzeitprognose nach Schädel-Hirnverletzungen, aber für die Untersuchung des sekundären Hirnschadens ebenfalls weniger als das CCI geeignet (Albert-Weissenberger und Siren, 2010).

4.1.2 V_{1a}-Rezeptor knock-out Modell und Validierung von Ausgangswerten

Vasopressin und V₁-Rezeptoren scheinen eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie von diversen Hirnschädigungen wie fokale Ischämie, intrazerebrale Blutung und nach Schädel-Hirnverletzungen zu spielen (Vakili et al., 2005; Kleindienst et al., 2006; Okuno et al., 2008; Trabold et al., 2008; Taya et al., 2008; Liu et al., 2010; Manaenko et al., 2011). Bisher wurden Vasopressin-Rezeptoren pharmakologisch gehemmt und dafür peptidische oder *small molecule* AVP Rezeptor-Antagonisten intraventrikulär injiziert. Bisher konnte jedoch eine unspezifische Bindung an andere G-protein-gekoppelte Rezeptoren oder eine verminderte Affinität der Antagonisten an V_{1a}- bzw. V₂-Rezeptoren nicht sicher ausgeschlossen werden. Die genannten Untersuchungen waren wesentliche Basis für die Hypothesengenerierung und die Wahl des hochspezifischen homozygoten V_{1a}-Rezeptor knock-out Mausmodells (V_{1a}^{-/-}).

Die Maus ist die, dem Menschen genetisch ähnlichste Art, bei der bisher ein Gen knock-out möglich ist. Wie bereits unter 2.1.2 erwähnt, basiert der genetische Background der homozygoten V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse auf 129 Sv und C57/BL6J Mäusen (Koshimizu et al., 2006). Da die Mäuse mehr als acht Generationen in den C57/BL6 Hintergrund zurückgekreuzt wurden, konnten C57/BL6 Mäuse als Kontrollen verwendet werden. V_{1a}-Rezeptor knock-out Mäuse unterscheiden sich phänotypisch nicht von ihrem Wildtyp. Wachstum, Entwicklung, Herzfunktion, Herzfrequenz sowie Vasopressin-Serumspiegel differieren ebenfalls nicht. Dagegen ist der Blutdruck von V_{1a}^{-/-} Mäusen um 7% niedriger, das Blutvolumen um 9% geringer sowie die adrenocorticotrope Stressantwort vermindert (Koshimizu et al., 2006). Auch scheint das Sozialverhalten der V_{1a}^{-/-} Mäuse hinsichtlich Ängstlichkeit reduziert (Egashira et al., 2007).

	V _{1a} -Rezeptor knock-out versus Wildtyp
V_{1a}-Rezeptor Gen:	Teile des ersten Exons und Introns entfernt
Phänotyp:	kein Unterschied (k.U.)
Wachstum und Entwicklung:	k.U.
Kardiovaskulär: <ul style="list-style-type: none"> • Herzfrequenz/-funktion • Blutdruck • Blutvolumen • Baroreflex 	k.U. 7% niedriger 9% geringer vermindert
Hormonell: <ul style="list-style-type: none"> • Vasopressin-Serumspiegel • Adrenocorticotrope Antwort 	k.U. vermindert
Sozialverhalten:	reduzierte Angst

Tabelle 7: Vergleichende Übersicht verschiedener Parameter der V_{1a}-Rezeptor knock-out und Wildtyp Mäuse

Validierung von Ausgangswerten:	
	V _{1a} -Rezeptor knock-out versus Wildtyp
Physiologische Parameter: <ul style="list-style-type: none"> • MAP • ICP • CBF (kontralateral) 	k.U. k.U. k.U.
Hirnwassergehalt: <ul style="list-style-type: none"> • Ausgangswerte 	k.U.
Gewicht: <ul style="list-style-type: none"> • Ausgangswerte 	k.U.
Neurologische Funktion (NSS): <ul style="list-style-type: none"> • Ausgangswerte 	k.U.
Aquaporin mRNA: <ul style="list-style-type: none"> • AQP1 Ausgangswerte • AQP4 Ausgangswerte • AQP9 Ausgangswerte 	k.U. k.U. k.U.
Aquaporin Proteinexpression: <ul style="list-style-type: none"> • AQP1 Ausgangswerte • AQP4 Ausgangswerte 	k.U. k.U.

Tabelle 8: Validierung von Ausgangswerten der V_{1a}-Rezeptor knock-out und Wildtyp Mäuse

Die physiologischen Parameter MAP, ICP und CBF waren 3 Minuten vor und bis 30 Minuten nach CCI bei den Wildtyp und V_{1a}^{-/-} Mäusen ohne signifikanten Unterschied. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die beobachteten, neuroprotektiven Effekte im V_{1a}-Rezeptor knock-out Modell höchst wahrscheinlich nicht von systemischen oder vaskulären Effekten verursacht waren. Die V_{1a}^{-/-} Mäuse zeigten nach Erwachen aus der Narkose einen geringfügig, nicht signifikant, niedrigeren MAP im Vergleich zu ihrem Wildtyp, wodurch die Aussage möglicherweise eingeschränkt ist. In der Literatur ist ein um 7% niedrigerer Blutdruck bei wachen V_{1a}^{-/-} Mäusen, gemessen in der A. carotis, beschrieben. Fraglich ist, ob diese Blutdruckdifferenz tatsächlich in der komplexen Pathophysiologie nach Schädel-Hirntrauma relevant ist (Rauen et al., 2013). Insgesamt führt ein niedrigerer MAP zu einem erniedrigten zerebralen Perfusionsdruck mit vergrößertem, posttraumatischem Sekundärschaden. Auf Grund des niedrigeren arteriellen Blutdrucks bei den V_{1a}^{-/-} Mäusen wurde daher der beobachtete neuroprotektive Effekt eher unter- als überschätzt.

Die Ausgangswerte der Zielparameter Hirnwassergehalt, Gewicht, neurologische Funktion (NSS), quantitative Analyse der Aquaporin Expression auf mRNA- und Proteinebene waren bei beiden Tiergruppen gleich.

4.1.3 Auswahl der Aquaporine

In der Literatur variiert die Angabe zur Anzahl der zerebralen Aquaporine, schließt man *in vitro* Untersuchungen ein. Von Badaut et al. wurden bisher 7 Aquaporine im Nagerhirn beschrieben: AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9 und AQP12; *in vivo* waren eindeutig

bisher AQP1, AQP4 und AQP9 im Nagerhirn sowie im Gehirn von Makaken und Säugetieren nachweisbar (Badaut et al., 2002; Yool, 2007; Badaut et al., 2007; Zelenina, 2010; Albertini und Bianchi, 2010; Arcienega et al., 2010; Badaut et al., 2011). Daher wurden für die vorliegenden Untersuchungen AQP1, 4 und 9 ausgewählt, um ihre Bedeutung für den posttraumatischen Hirnwassertransport und die posttraumatische Hirnödementstehung zu untersuchen. Zusätzlich interessierte, ob die gezeigten anti-ödematösen Effekte durch V_{1a} -Rezeptor Deletion über AQP1, 4 und 9 vermittelt werden. AQP1 und AQP4 zählen, wie bereits in Abschnitt 1.3 dargestellt, zu den hochwasserpermeablen Wasserkanälen und sind an verschiedenen Grenzflächen zwischen Hirngewebe und Flüssigkeits-Kompartimenten beschrieben (Nielsen et al., 1997; Rash et al., 1998; Tait et al., 2008). AQP9 ist ein Aquaglyceroporin und zählt zu den niedrigwasserpermeablen Transportkanälen und scheint eine Rolle im Energiemetabolismus zu spielen (Badaut et al., 2004; Badaut et al., 2008; Badaut, 2010; Badaut et al., 2011).

Ob neben AQP1, AQP4 und AQP9 andere Aquaporine in der Pathophysiologie von Hirnverletzungen eine Rolle spielen, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. AQP2 wurde durch Untersuchung humaner Microarrays auf Ependym, im Rückenmark, subkortikal in der weißen Substanz und im Hippocampus nachgewiesen (Mobasheri et al., 2005). In verschiedenen Zellkulturen der Ratte wurde AQP3, AQP5 und AQP8 sowohl auf Astrozyten als auch auf Neuronen nachgewiesen (Yamamoto et al., 2001b; Yang et al., 2009; Yang et al., 2012).

4.1.4 Auswahl der Aquaporin Nachweismethoden

Prinzipiell muss zwischen Nachweismethoden am Gewebeschnitt versus Gewebeextrakt unterschieden werden. Um eine Aussage über die Expression der Zielproteine sowie deren Prozessierung zu ermöglichen, wurde je ein Verfahren zur Detektion des Zielgens auf mRNA Ebene aus Gewebeextrakt und auf Proteinebene an Gewebeschnitten gewählt (Böcker et al., 2008).

4.1.4.1 Quantitative Aquaporin Analyse auf mRNA Ebene

Für die quantitative Analyse der Protein-kodierenden mRNA aus Gewebeextrakt wurde das etablierte Verfahren der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt. Die RT-PCR zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus und ermöglicht eine exakte Quantifizierung bereits geringer Zielgen-Mengen (Huggett et al., 2005). Voraussetzung dafür war die mausspezifische Primer-Entwicklung für Aquaporin 1, 4, und 9. Die spezifische Primer-Hybridisierung im Maushirn wurde bereits in Kapitel 3.2.1 dargestellt. Valide Ergebnisse mit RT-PCR erfordern vier wesentliche Schritte: erstens die Normalisierung der Probengröße, zweitens die Quantifizierung der mRNA, drittens das Überprüfen der mRNA Qualität und viertens den Einsatz eines Referenzgens (Huggett et al., 2005). Die Normalisierung der Probengröße wurde durch Verwendung von je 60 mg Gewebeproben

des traumatisierten rechten oberen und kontralateralen linken unteren Quadranten erreicht; letzterer sicher nekrosefrei. Die mRNA wurde photometrisch quantifiziert und ihre Qualität, also Reinheit, wie bereits in Abschnitt 2.3.3.2 beschrieben, überprüft. Als Referenzgen wurde β -Aktin eingesetzt, da es bereits für die Analyse nach CCI etabliert war (Thal et al., 2008). Entsprechend der Empfehlungen von Huggett et al. wurde β -Aktin in dem verwendeten Versuchsprotokoll reevaluiert (Huggett et al., 2005).

Die Aussagekraft der RT-PCR ist allgemein durch zwei Faktoren limitiert. Durch die Verwendung eines Gewebeextraktes und des Transkriptoms, also der RNA, resultiert Ungenauigkeit. Die Menge des Transkriptoms ist abhängig von der Zellaktivität, die wiederum durch Physiologie, Pathologie sowie Entwicklung der Zelle variiert (Bustin und Nolan, 2004). Der Gewebeextrakt enthält posttraumatisch unterschiedlich viel extravasales Blut, so dass daraus möglicherweise ein verändertes Transkriptom resultiert. AQP9 wird auf mRNA haltigen Leukozyten exprimiert (Ishibashi et al., 1998; Tsukaguchi et al., 1999) und könnte dadurch die vorliegenden AQP9 Ergebnisse beeinflussen und verändern. Dahingegen ist die Quantifizierung von AQP1 mit der RT-PCR einer Quantifizierung mit Western Blot überlegen. AQP1 ist auf Erythrozyten, die keine mRNA enthalten, lokalisiert, so dass das Ergebnis der RT-PCR durch posttraumatische Blutung nicht beeinflusst wird. Die Analyse auf Proteinebene mit dem Western Blot könnte dagegen möglicherweise gestört werden.

Alternativ wird zur quantitativen mRNA Analyse der Northern Blot als Goldstandard in der Literatur empfohlen (Bhardwaj et al., 2012). Nachteil ist, dass größere RNA Mengen zur Analyse erforderlich sind, so dass das Verfahren, insbesondere zur Analyse von AQP1 und AQP9, ungeeignet war. Am Gewebeschnitt ist die *in-situ* Hybridisierung als überwiegend qualitatives Verfahren geeignet, für die quantitative Fragestellung dieser Arbeit jedoch ebenfalls unterlegen (Luttmann W. et al., 2009a).

4.1.4.1.1 β -Aktin als Housekeeping-Gen

Für die Auswahl des geeigneten Housekeeping-Gens (HKG) als Referenzgen ist die Validierung in der geplanten Versuchsanordnung wesentlich (Dheda et al., 2004; Huggett et al., 2005). Das ideale HKG wäre unter allen Bedingungen konstant exprimiert (Thellin et al., 1999). Aussagen über die etablierten HKG divergieren jedoch in der Literatur. Tatsächlich findet also eine Regulation der HKG in Abhängigkeit u.a. von Geschlecht, Hirnareal und Art des Stressors statt (Derks et al., 2008). Beispielsweise wird β -Aktin in einem geschlossenen Schädel-Hirntrauma Modell mit resultierendem diffusen Axonschaden signifikant hochreguliert und sollte als Referenzgen vermieden werden (Rhinn et al., 2008). Dagegen ist β -Aktin bis 24 Stunden nach CCI im Mausmodell als HKG geeignet (Thal et al., 2008). Die für diese Arbeit durchgeführte Reevaluation von β -Aktin als Referenzgen nach CCI ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen ($p=0,298$). Die von Thal et al. beschriebene große Streubreite von β -Aktin bestätigte sich in

den vorliegenden Ergebnissen bei den Wildtyp Mäusen nicht. Nachteilig war, dass je Untersuchungszeitpunkt ein statistischer Ausreißer für β -Aktin vorhanden war. In der Gruppe der Wildtyp Mäuse wurde β -Aktin 24 Stunden nach CCI geringfügig hochreguliert. Bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen fiel eine höhere Streubreite von β -Aktin sowohl in der Gruppe der unbehandelten Mäuse als auch 24 Stunden nach CCI auf. Zusammenfassend war also β -Aktin in dem verwendeten Modell als HKG geeignet. Durch die genannten Beobachtungen muss von einer eher konservativen Auswertung der vorliegenden Ergebnisse ausgegangen werden.

4.1.4.1.2 Quantitative Auswertung mit der Standardmethode

Die AQP1, 4 und 9 mRNA wurde mit der Standardmethode quantifiziert. Diese wurde gewählt, da sie sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit auch kleiner Zielgenmengen auszeichnet (Hunt, 2010). Der mitgeführte externe Standard ermöglicht eine relative Quantifizierung der jeweiligen cDNA und detektiert Amplifikationsfehler. Durch die mitgeführte Negativkontrolle werden Verunreinigungen sichtbar.

Die Schmelzkurvenanalyse deckt in jeder RT-PCR mögliche unspezifische PCR-Produkte auf. Die Schmelzkurven der vorliegenden Ergebnisse ergaben keinen Hinweis auf unspezifische Primer Dimer Bindung. Mit der RT-PCR wird der Schwellenwert, der sogenannte Ct-Wert, bestimmt. Dieser Wert entspricht dem exponentiellen Anstieg des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes als Hinweis auf die cDNA-Amplifikation. Um die Varianz der mRNA Regulation zu präzisieren, wurde jede Probe daher für jeden Zeitpunkt auf die tieräquivalente β -Aktin cDNA bzw. mRNA Menge normiert (Bustin und Nolan, 2004; Bustin et al., 2010; Hunt, 2010).

In der Literatur wird die Auswertung und Darstellung der RT-PCR Ergebnisse allgemein als unzureichend bemängelt (Bustin et al., 2010). Sowohl die Delta-Delta Ct-Methode ($\Delta\Delta Ct$) als auch die Pfaffl-Methode erfordern eine nahezu gleiche Effizienz von Ziel- und Kontrollgen. Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode stellt eine Annäherungsmethode dar. Die Pfaffl-Methode verzichtet auf einen externen Standard, sodass Amplifikationsfehler übersehen werden können (Pfaffl, 2001; Hunt, 2010). Zusammenfassend schien die Standardmethode für die vorliegende Untersuchung am besten geeignet.

4.1.4.2 Quantitative Aquaporin Analyse auf Proteinebene

Prinzipiell können Proteine in einem Proteingemisch durch einen Western Blot und an einem Gewebeschnitt immunhistochemisch quantifiziert werden. Die Immunhistochemie erlaubt zusätzlich die Lokalisationsanalyse. Eine rein quantitative Analyse von AQP1 und 9 aus einem Gewebeextrakt kann durch ihre Expression auf Erythrozyten bzw. Leukozyten verändert werden. Daher wurde die immunhistochemische Analyse mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern an Gewebeschnitten eingesetzt. Bei allen Methoden der

Proteinquantifizierung ist die Wahl des Antikörpers entscheidend. Um Aquaporine zu detektieren, wurde ein zweistufiges und indirektes Verfahren eingesetzt. Ziel war es, dadurch die Sensitivität zu steigern (Luttmann W. et al., 2009b). Als Primärantikörper wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper verwendet. Der Vorteil gegenüber monoklonalen Antikörpern liegt in einer einfacheren Herstellung. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass monoklonale Antikörper mehrere Epitope des Proteins binden ohne die Gesamtspezifität zu reduzieren. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um native Zustandsformen, denaturierte oder phosphorylierte Proteine zu erfassen (Luttmann W. et al., 2009c). Die Sekundärantikörper waren Fluoreszenz-markiert. Untersucht wurde der traumatisierte und nicht traumatisierte Kortex, um die Bedeutung von Aquaporinen für den posttraumatischen Hirnwassertransport in beiden Hemisphären zu ermitteln.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Das hochspezifische V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell wurde eingesetzt, um einerseits den Einfluss von V_{1a} -Rezeptoren auf den sekundären Hirnschaden nach Controlled Cortical Impact und andererseits mögliche V_{1a} -Rezeptor-vermittelte Regulationsmechanismen auf zerebrale Aquaporine zu untersuchen.

4.2.1 Neuroprotektive Effekte im V_{1a} -Rezeptor knock-out Modell

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die genetische Deletion des V_{1a} -Rezeptors zu neuroprotektiven Effekten nach experimentellem Schädel-Hirntrauma führt. Im Vergleich zum Wildtyp waren sowohl die Ausbildung des posttraumatischen Hirnödems als auch das Kontusionsvolumen signifikant reduziert. Der posttraumatische Gewichtsverlust, als Parameter für den Allgemeinzustand der Maus, war in der V_{1a} -Rezeptor knock-out Gruppe signifikant gegenüber den Wildtyp Mäusen geringer. Auch die neurologische Funktion war in der Gruppe der V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäuse signifikant verbessert (Rauen et al., 2013).

4.2.1.1 Vasopressin in der Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas

Arginin-Vasopressin (AVP) spielt sehr wahrscheinlich bei unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Nach Schädel-Hirntrauma wurde in humanen Serumproben ein erhöhter AVP Gehalt nachgewiesen, der positiv mit der Verletzungsschwere korrelierte (Huang et al., 2003; Cintra et al., 2004; Xu et al., 2007). Barreca untersuchte nach ischämischem Schlaganfall humane Serumproben und fand unabhängig von der Osmo- und Barorezeptor-Regulation erhöhte AVP Serumspiegel, die wiederum positiv mit der Schwere der Läsion und Schwere des neurologischen Defizites korrelierte (Barreca et al., 2001). Erhöhte AVP Liquorspiegel wurden ausschließlich bei Patienten mit neurologischen Funktionsstörungen, die mit intrakranielltem Druckanstieg vergesellschaftet waren, nachgewiesen (Sorensen et al., 1985).

Welche Mechanismen führen nun zu dieser erhöhten AVP Serum- und Liquorkonzentration? Frühere tierexperimentelle Studien an Katzen konnten eine Aktivierung der neurosekretorischen Hypothalamus-Hypophysen-Achse belegen. Diese Aktivierung war sehr wahrscheinlich Folge einer ischämischen Anoxie während eines plötzlichen intrakraniellen Druckanstieges. Bemerkenswert erscheint, dass eine Korrelation zwischen intrakranieller Hypertension, systemischem arteriellen Blutdruck und erhöhter AVP Serumkonzentration, unabhängig vom Salzgehalt und der Blutosmolalität nachweisbar war; und zwar nur nach experimenteller zerebraler Kompression und nicht nach experimenteller Subarachnoidalblutung (SAB) (Rap und Chwalbinska-Moneta, 1978). Letztere Beobachtung unterstreicht die unterschiedliche Pathophysiologie des SHT und der SAB. Während das SHT vor allem zu einem Hirnödem führt, ist in der Pathophysiologie der SAB zusätzlich zum akuten ICP-Anstieg der Cushing Reflex entscheidend (Hockel et al., 2012).

Neuere experimentelle Untersuchungen an Ratten konnten eine erhöhte AVP Synthese nicht nur im Hypothalamus, sondern auch im periläsionalen Kortex, im Hippocampus und Corpus callosum, wie in Abbildung 39 dargestellt, zeigen. AVP wurde bereits 6 Stunden nach CCI überwiegend in aktivierter Mikroglia und Makrophagen, assoziiert mit kortikalen Mikrogefäßen, nachgewiesen. Zu einem kleineren Anteil wurde AVP auch im zerebrovaskulären Endothel synthetisiert. Das Maximum der AVP Expression wurde 1 Tag nach dem Trauma erreicht. Die AVP positiven Zellen verringerten sich bereits 2 Tage nach dem Trauma erheblich (Szmydynger-Chodobska et al., 2011).

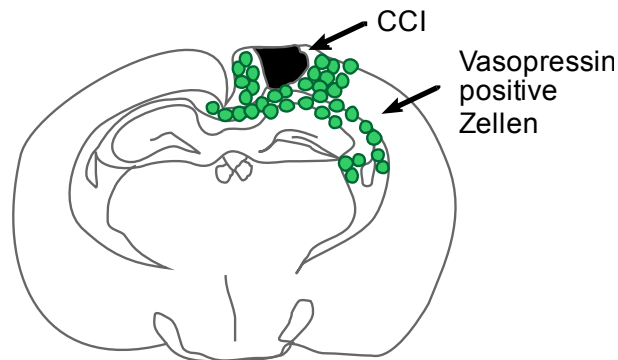


Abbildung 39: Arginin-Vasopressin positive Zellen (grün) am koronaren Rattenhirnschnitt nach CCI

Das Maximum der zentralen Arginin-Vasopressin-Synthese wurde 1 Tag nach CCI im Rattenmodell nachgewiesen. Abbildung modifiziert nach Szmydynger-Chodobska et al. (2011).

Bereits 1978 beschrieben Buijs et al. AVP-haltige axonale Fortsätze, die vom Nucleus paraventricularis des Hypothalamus bis an die Seitenventrikel reichten (Buijs et al., 1978). Im Endothel des Plexus choroideus wurde ebenfalls eine AVP Synthese nachgewiesen, sodass von einer direkten AVP Freisetzung in den Liquor sowie einer autokrinen oder parakrinen Funktion ausgegangen wird (Chodobski et al., 1997).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Arginin-Vasopressin Ausschüttung sowohl aus der Neurohypophyse als auch die Freisetzung aus Mikroglia, zentralen Makrophagen und dem zerebrovaskulären Endothel möglicherweise eine entscheidende Rolle in der posttraumatischen und postischämischen Pathophysiologie spielt (Rauen et al., 2013).

4.2.1.2 Verteilung der zerebralen Vasopressin-Rezeptoren

Arginin-Vasopressin ist ein Ligand für drei G-Protein-gekoppelte heptahelikale Membranrezeptoren (Thibonnier et al., 1998). Wie aus den Voruntersuchungen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich, sind zerebrale V_{1a} -Rezeptoren in der posttraumatischen Pathophysiologie wesentlich. Die periphere Lokalisation von V_{1a} -Rezeptoren hauptsächlich auf glatten Muskelzellen und die über Vasokonstriktion vermittelte systemische Blutdruckregulation sind bereits gut bekannt. Darüber hinaus sind V_{1a} -Rezeptoren auch im zentralen Nervensystem weit verbreitet (Tribollet et al., 1998) und sehr

wahrscheinlich, neben anderen Faktoren, Vermittler der Hirnödementstehung (Rosenberg et al., 1990; Rosenberg et al., 1992; Vakili et al., 2005; Trabold et al., 2008).

Tierexperimentell wurde die Lokalisation von V_{1a} -Rezeptoren im fronto-parietalen Kortex von Ratten untersucht. Im unverletzten fronto-parietalen Kortex wurde die Expression von V_{1a} -Rezeptoren auf neuronalen Zellkernen, Astrozyten sowie apikal im Epithel des Plexus choroideus nachgewiesen. Posttraumatisch wurde im fronto-parietalen Kortex der Ratte eine kurzzeitige Hochregulation der V_{1a} -Rezeptoren auf dem Endothel sowohl von kleinen als auch großen Blutgefäßen gefunden. Darüber hinaus wurde auch eine langzeitige Hochregulation der V_{1a} -Rezeptoren auf kortikalen Astrozyten, angrenzend an die posttraumatische Läsion, für einen Zeitraum von 14 Tagen detektiert. Hervorzuheben ist dabei die beobachtete Umverteilung der V_{1a} -Rezeptoren vom Soma in Richtung der Astrozyten-Fortsätze (Szmydynger-Chodobska et al., 2004). In diesem Zusammenhang sind drei Punkte herauszustellen: erstens der zeitliche Aspekt dieser V_{1a} -Rezeptor Expression, der mit der Dauer des posttraumatischen Hirnödems korreliert, zweitens die Lokalisation auf den Astrozyten Endfüßchen, die engen Kontakt zum Endothel der Blut-Hirn-Schranke bilden und drittens sind diese perivaskulären Astrozyten Endfüßchen Hauptort der Aquaporin 4 (AQP4) Expression; also des ubiquitären zerebralen Wasserkanals (Nielsen et al., 1997; Amiry-Moghaddam et al., 2003a; Verkman et al., 2006; Yukutake und Yasui, 2010). Außerdem wurde eine erhöhte V_{1a} -Rezeptor Expression auf Neuronen mit vergrößerten Varikositäten ihrer axonalen Fortsätze nachgewiesen. Diese Beobachtung könnte möglicherweise in Zusammenhang mit der AQP4 Regulation stehen. Der zeitliche Verlauf der AVP sowie V_{1a} -Rezeptor Hochregulation ist sehr ähnlich und könnte Ausdruck einer AVP-vermittelten Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke mit Exazerbation des posttraumatischen Hirnödems sein (Pascale et al., 2006; Rauen et al., 2013).

4.2.1.3 Molekulare Mechanismen

Arginin-Vasopressin bestimmt über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden die Pathophysiologie des Schädel-Hirntraumas und scheint dabei seine Wirkung zu perpetuieren. Zwei AVP-vermittelte Signalkaskaden werden unterschieden (Abbildung 5). Der aktivierte V_{1a} -Rezeptor setzt die Proteinkinase C (PKC), der aktivierte V_2 -Rezeptor die Proteinkinase A (PKA) Kaskade in Gang (Thibonnier et al., 1998; Birnbaumer, 2000). Letztere scheint, wie Voruntersuchungen ergaben, für den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirntrauma ohne Bedeutung (Trabold et al., 2008).

Die aktivierte PKC führt zu folgenden molekularen Prozessen. Erstens steigt intrazellulär die Calciumionen-Konzentration und bewirkt eine Vasokonstriktion (Birnbaumer, 2000; Maybauer et al., 2008). Zweitens wird das Fos/Jun-Protein aktiviert. Daraus resultiert wiederum eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein 1 (AP1) und des *cAMP Resonsive Elements* (CRE) in der AVP Promotorregion mit Signal für die AVP Gentranskription (Yoshida et al., 2006). Drittens wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Neves

et al., 2002) aktiviert. Viertens wurde eine V_{1a} -Rezeptor-vermittelte Kurzzeit-Internalisierung von Aquaporin 4 durch Phosphorylierung in einer *in vitro* Studie an *Xenopus Oozyten* nachgewiesen (Moeller et al., 2009).

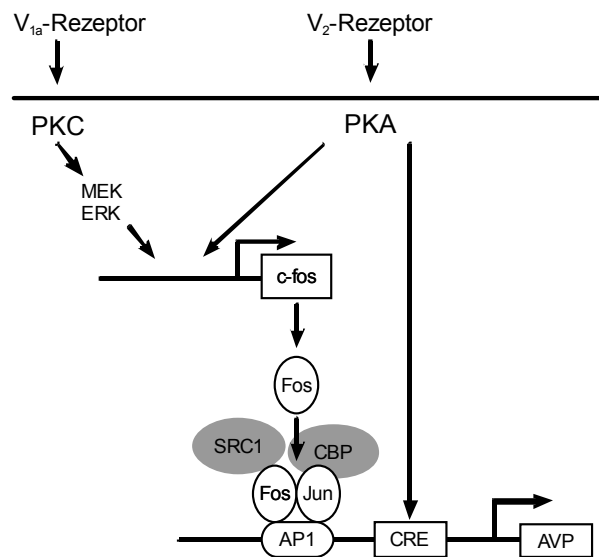


Abbildung 40: V_{1a} -Rezeptor-vermittelte intrazelluläre Signalkaskade

Die aktivierte Proteinkinase C (PKC) führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Arginin-Vasopressin (AVP) Gentranskription. Abbildung modifiziert nach Yoshida et al. (2006).

Im Gegensatz zu dieser beobachteten AQP4 Kurzzeit-Internalisierung an *Xenopus Oozyten* wurde nach intraventrikulärer Injektion eines V_{1a} -Rezeptor-Antagonisten an Mäusen eine AQP4 Hochregulation und Reduktion des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach MCAo detektiert (Liu et al., 2010). Eine weitere posttraumatische Wirkung von AVP verläuft synergistisch mit dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und resultiert über die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) in der Amplifikation pro-inflammatorischer Mediatoren wie Chemokine und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9). Dadurch führt der gesteigerte Einstrom von Entzündungszellen neben anderen Faktoren zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (Szmydynger-Chodobska et al., 2010).

Darüber hinaus aktiviert AVP über den V_{1a} -Rezeptor-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration sowohl den Na^+/H^+ Austauscher als auch den $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ Co-Transporter. Beide Transporter sind an der Hirnödementstehung beteiligt (O'Donnell et al., 2005; Lam et al., 2009). Diese verschiedenen molekularen Mechanismen bedürfen weiterer Untersuchungen, um den Einfluss der V_{1a} -Rezeptoren sowie die Regulation und Bedeutung von Aquaporinen in der posttraumatischen Hirnödementwicklung besser zu verstehen (Rauen et al., 2013).

4.2.2 Analytik

Die entwickelten murinen Aquaporin 1, 4 und 9 Primer mit niedriger Produktlänge für AQP1 222 Basenpaaren (bp), für AQP4 144 bp und für AQP9 194 bp waren im Maushirn

spezifisch. Die niedrige Produktlänge der entwickelten Primer war wichtige Voraussetzung für eine valide Auswertung der quantitativen Analyse mit dem Verfahren der RT-PCR (Rychlik, 1995).

AQP1 wurde durch je eine spezifische Bande in murinem Leber-, Pankreas-, Nieren- und Hirngewebe nachgewiesen. Die Expression von AQP1 in Leber, duktalem Pankreas (Matsuzaki et al., 2004), Niere (Deen et al., 1992; Nielsen et al., 1993b) sowie der apikalen Membran des Epithels des Plexus choroideus war bereits aus der Literatur bekannt (Agre et al., 1993; Nielsen et al., 1993a).

AQP4 und 9 wurde in muriner Leber, Niere und Hirn detektiert. Der entwickelte AQP4 Primer zeigte im Lebergewebe nach qualitativer PCR zwei Banden, nämlich bei der erwarteten Produktlänge von 144 bp und bei ca. 580 bp. Verschiedene Ursachen für diese zweite AQP4 Bande mit einer Länge von ca. 580 bp sind denkbar. Einerseits könnte eine unterschiedliche und erhöhte Enzymaktivität in der hochmetabolisch aktiven Leber ursächlich sein. Denkbar wäre auch eine doppelte Primer Dimer Bildung. In der elektronischen PCR wurde theoretisch eine Produktlänge von 580 bp erwartet, jedoch dort nicht als Ergebnis angezeigt. Daher muss auch von entsprechend längerem AQP4 Produkt ausgegangen werden (Abbildung 19). Aus den folgenden Gründen wurde der entwickelte AQP4 Primer für unsere Untersuchungen als geeignet betrachtet und eingesetzt. Erstens band der AQP4 Primer im Maushirn spezifisch, zweitens ergab die elektronische PCR genau einen Treffer mit der erwarteten Produktlänge von 144 bp, drittens bestand nach der Schmelzkurvenanalyse für AQP4 im LightCycler® kein Hinweis auf Primer Dimer Bildung. Zusätzlich wurde das Verfahren des *Hot Starts* im LightCycler® eingesetzt, welches die Primer Dimer Bildung minimiert (Chou et al., 1992). Nach Abwägung und anschließender Plausibilitätsprüfung der erhobenen Ergebnisse wurde, trotz AQP4 Doppelbande im Lebergewebe, der murine AQP4 Primer für die zerebrale Untersuchung eingesetzt. Insbesondere auch deshalb, da die Herstellung eines spezifischen murinen AQP4 Primers mit optimaler Produktlänge für das RT-PCR Verfahren äußerst schwierig war.

AQP9 wurde im murinen Leber-, Hirn- und Nierengewebe nachgewiesen. Der Nachweis von AQP9 in Leber und Maushirn auf mRNA Ebene war konform zu den Literaturangaben (Badaut et al., 2001; Badaut et al., 2004; Badaut und Regli, 2004). Die deutlichste Bande war im Lebergewebe zu sehen. Mylonakou et al. wies eine AQP9 mRNA Konzentration im Ratten- bzw. Maushirn von 3% bzw. 0,5% der AQP9 mRNA Konzentration im Lebergewebe nach (Mylonakou et al., 2009). Unklar bleibt, ob AQP9 tatsächlich im murinen Nierengewebe exprimiert wird. Denkbar wäre ein verfälschtes Ergebnis durch AQP9 mRNA aus Leukozyten (Tsukaguchi et al., 1999; Elkjaer et al., 2000; Carbrey et al., 2003).

4.2.3 Aquaporine

Ein sehr effektiver, schneller und hochspezifischer Wassertransport erfolgt im Gehirn transzellulär über die, bereits im Abschnitt 1.3 beschriebenen, Aquaporine. Die zerebrale

Wasserhomöostase ist wesentliche Bedingung für eine intakte Hirnfunktion, basierend auf einem Volumen- und Ionengleichgewicht. Nervenzellen sind eng von Gliazellen umgeben, sodass im Hirnparenchym ein nur kleiner flüssigkeitsgefüllter Extrazellulärraum existiert. Bereits kleinste Flüssigkeitsverschiebungen führen zu einer veränderten Ionenkonzentration und folglich zu einer veränderten neuronalen Erregbarkeit (Fishman, 1974; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Zador et al., 2007).

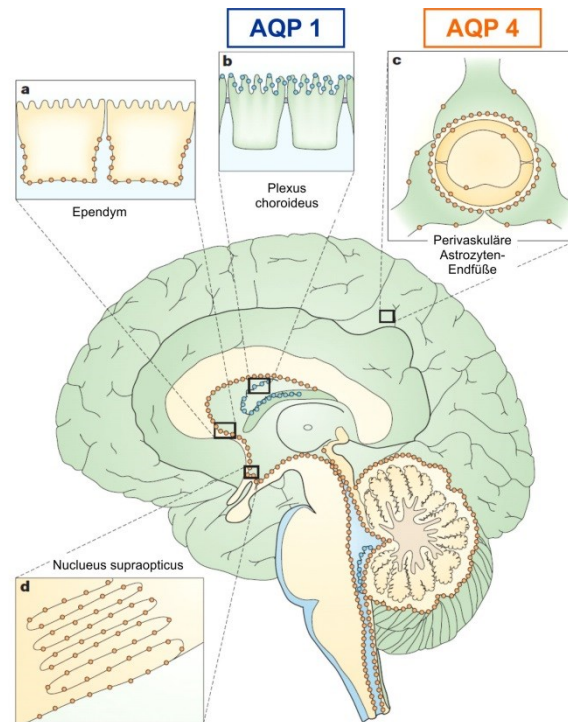


Abbildung 41: Aquaporin 1 und Aquaporin 4 Lokalisation

Bisher wurde die Lokalisation von AQP1 (*blau*) apikal auf dem Epithel des Plexus choroideus nachgewiesen. Die Lokalisation von AQP4 (*orange*) ist auf dem basolateralen Ependym, auf den perivaskulären Astrozyten Endfüßen und auf glialen Lamellen des Nucleus supraopticus beschrieben (Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003). Modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Neuroscience.

Unter physiologischen Bedingungen wurde die höchste Wasserpermeabilität an *Xenopus Oozyten* für AQP4, gefolgt von AQP1, nachgewiesen (Yang und Verkman, 1997). Die bisher bekannte Lokalisation von AQP1 und AQP4 an den Grenzflächen der Blut-Liquor- und Blut-Hirn-Schranke ist in Abbildung 41 schematisch dargestellt (Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003).

4.2.3.1 Quantifizierung von Aquaporin 1, 4 und 9 auf mRNA Ebene

Erstmals konnte eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige Hochregulation von AQP1 mRNA 24 Stunden nach CCI sowie eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige konstitutive Expression von AQP4 mRNA 6 und 24 Stunden nach CCI im Mausmodell gezeigt werden. Dagegen wurde AQP9 auf Transkriptionsebene sowohl in Wildtyp als auch V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen 24 Stunden nach CCI nicht reguliert.

4.2.3.2 Lokalisation und Quantifizierung von Aquaporin 1 und 4 auf Proteinebene

AQP1 wurde erstmals auf kortikalen Neuronen sowohl in Wildtyp als auch in V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen nachgewiesen. Die Lokalisation von AQP1 auf dem Epithel des Plexus choroideus wurde bestätigt. AQP1 wurde in der kontralateralen Hemisphäre bis 24 Stunden nach CCI V_{1a} -Rezeptor-abhängig kurz- und langfristig reguliert.

AQP4 wurde ubiquitär auf kortikalen und subkortikalen Gliazellen nachgewiesen. AQP4 ist auf perivaskulären Astrozyten Endfüßchen, auf der Kortexoberfläche im Bereich der Meningen, im Plexus choroideus, im Stratum radiatum des Hippocampus und subkortikal lokalisiert und überwiegend polar organisiert. Nach experimenteller Hirnischämie wurde kürzlich der Verlust der polaren Organisation von AQP4 mit Umverteilung von AQP4 über die gesamte Astrozyten-Zelloberfläche unter Aussparung der Endfüßchen gezeigt. Möglicherweise ist dieser Mechanismus für der Entstehung des zytotoxischen Hirnödems protektiv (Steiner et al., 2012). Um ein möglicherweise auch posttraumatisch verändertes Expressionsmuster von AQP4 auf Astrozyten noch genauer zu erfassen, wäre daher eine zusätzliche Färbung des Kapillarendothels mit einer von-Willebrand-Färbung ergänzend sinnvoll. AQP4 wurde periläsional V_{1a} -Rezeptor-abhängig kurzzeitig hochreguliert. 24 Stunden nach CCI entsprach die AQP4 Expression wieder dem Ausgangswert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass AQP1 erstmals auf kortikalen Neuronen sowohl in Wildtyp als auch in V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen nachgewiesen wurde. Eine valide quantitative AQP1 Analyse auf Proteinebene war auf Grund der posttraumatischen Blutung mit AQP1 Expression auf Erythrozyten nur in der kontralateralen Hemisphäre möglich. AQP4 wurde auf kortikalen und subkortikalen Gliazellen ubiquitär nachgewiesen und wurde hauptsächlich periläsional reguliert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass AQP1 und AQP4 einer V_{1a} -Rezeptor-abhängigen, posttraumatischen Kurz- und Langzeitregulation im Mausmodell unterliegen.

4.2.3.3 Regulationsmechanismen

Aquaporine werden unter anderem durch Permeabilitätsänderung, veränderte Expression sowie subzelluläre Lokalisation reguliert (Gunnarson et al., 2004; Carbrej und Agre, 2009; Zelenina, 2010; Yukutake und Yasui, 2010). Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Wesentlich ist die Unterscheidung zwischen Kurz- und Langzeitregulation. Die Kurzzeitregulation erfolgt innerhalb von Sekunden und Minuten durch Permeabilitätsänderung sowie gesteigerten Einbau von AQP in die Zellmembran bzw. durch Internalisierung. Dieser Mechanismus ist bereits für AQP2 in der Niere bzw. AQP4 in *Xenopus Oozyten* gut bekannt (Deen et al., 1994; Knepper und Inoue, 1997; Fenton und Moeller, 2008; Moeller et al., 2009). Dabei sind Phosphorylierung/Dephosphorylierung, intrazelluläre Signalkaskaden, pH-abhängige Protonierung von Aminosäuren, Metallionenbindung sowie Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung. Die Langzeitregulation

unterliegt der veränderten mRNA- und Proteinsynthese bzw. -degradation und verläuft innerhalb von Stunden bis Tagen (Zelenina, 2010).

4.2.3.4 Aquaporin 1

Bisher war die Lokalisation von AQP1 apikal auf den Epithelzellen des Plexus choroideus (Abbildung 41) bekannt (Nielsen et al., 1993a; Hasegawa et al., 1994; Maseguin et al., 2000; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Oshio et al., 2003; Oshio et al., 2005). Darüber hinaus wurde eine, wenn auch deutlich geringere, basolaterale AQP1 Expression beschrieben, welche einen transepithelialen Wassertransport in Richtung Liquor-Kompartiment vermuten lässt (Praetorius und Nielsen, 2006). Erstmals konnte durch die vorliegenden Ergebnisse eine konstitutive sowie posttraumatisch V_{1a} -Rezeptor-abhängige AQP1 Lokalisation auf kortikalen Neuronen, Neuronen des Hippocampus sowie auf neuronalen Fasersystemen nachgewiesen werden, wie die Co-Lokalisation mit dem neuronenspezifischen Marker NeuN verdeutlicht (Abbildung 24). Die genaue Bedeutung von AQP1 auf kortikalen Neuronen ist weiterhin unklar.

Während systemisch AQP1 auch auf Kapillarendothel exprimiert wird (Nielsen et al., 1993a), ist das zerebrovaskuläre Kapillarendothel unter physiologischen Bedingungen weitestgehend frei von AQP1 (Kobayashi et al., 2001; Zelenina, 2010). Dies stellt eine wesentliche Voraussetzung für eine intakte Blut-Hirn-Schranke dar. Ob AQP1 unter pathophysiologischen Bedingungen nach Hirnschädigung auf zerebralen Gefäßen exprimiert wird, ist bisher unklar.

Neben einem konstitutiven Wassertransport hat AQP1 eine zentrale Bedeutung für die Liquor-Produktion und Liquor-Zirkulation. AQP1 knock-out Mäuse haben eine um 25% geringere Liquor-Produktion sowie einen verminderten intrakraniellen Druck. Nach schwerem fokalen Schädel-Hirntrauma zeigten AQP1 knock-out Mäuse einen um 60% signifikant niedrigeren ICP und ein signifikant besseres Überleben gegenüber ihrem Wildtyp (Oshio et al., 2005). Möglicherweise stehen diese Beobachtungen in Zusammenhang mit einer AVP Synthese im Endothel des Plexus choroideus und resultieren aus einer AVP Freisetzung in den Liquor, wie bereits in Abschnitt 4.2.1.1 bereits dargestellt.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, ist in der Literatur eine Expression von AQP1 auch auf Astrozyten unter diversen pathologischen Bedingungen beschrieben. Eine sehr kleine Untersuchung von Suzuki et al. wies nach Hirnkontusion in ödematösen, humanen Gehirnpräparaten AQP1 auf aktivierten Astrozyten nach (Suzuki et al., 2006). Tierexperimentell wurde nach induziertem Trauma an Ratten sowie *in vitro* eine AQP1 Expression auf Astrozyten gefunden (McCoy und Sontheimer, 2010).

Kurzzeitregulation

Erstmals konnte *in vivo* durch die vorliegenden Ergebnisse eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige posttraumatische AQP1 Kurzzeitregulation auf Proteinebene nach CCI im Mausmodell gezeigt werden.

AQP1 hat vier Phosphorylierungsstellen und wird sowohl über die PKA als auch die PKC reguliert (Patil et al., 1997; Han und Patil, 2000; Zelenina, 2010). In *Xenopus Oozyten* ist bereits eine PKC-abhängige erhöhte AQP1 Wasser- und Ionenpermeabilität durch Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 157 und Threonin 239 (Zhang et al., 2007) sowie eine Vasopressin-abhängige AQP1 Aktivierung demonstriert worden (Patil et al., 1997).

Während initial AQP1 zu den selektiven und hochwasserpermeablen Wasserkanälen gezählt wurde, zeigen neuere, bisher noch kontrovers diskutierte Untersuchungen, dass AQP1 möglicherweise auch nichtselektiv für monovalente Kationen, wie beispielsweise Kalium- und Natriumionen, permeabel sein könnte. Diese Ionenpermeabilität wird offenbar über eine intrazelluläre Signalkaskade durch Aktivierung des *second messenger* cGMP mit konsekutiver Phosphorylierung von Tyrosin 253 am carboxyterminalen Ende reguliert (Yool et al., 1996; Anthony et al., 2000; Yool und Weinstein, 2002; Boassa und Yool, 2005; Campbell et al., 2012; Yool und Campbell, 2012). Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Modelle und Ergebnisse ist jedoch eine definitive Aussage hinsichtlich der Ionenpermeabilität von AQP1 bisher noch nicht gesichert (Saparov et al., 2001; Tsunoda et al., 2004; Zelenina, 2010). Es bleibt zu vermuten, dass durch einen aktivierten Ionentransport über die zentrale Pore des Tetramers (Abbildung 7) auch der Wassertransport über die vier Wasserporen gesteigert wird (Yool und Campbell, 2012). Ähnlicher Mechanismus ist für den parazellulären Wassertransport in Form des *solvent drag* bereits bekannt.

Wie in Abschnitt 1.2.2 aufgezeigt, verläuft die intrazelluläre Signalkaskade des aktivierten V_{1a} -Rezeptors über die PKC. In diesem Zusammenhang sind die posttraumatischen, anti-ödematösen Effekte durch den V_{1a} -Rezeptor Gen knock-out molekular erklärbar.

Langzeitregulation

Erstmals konnte durch die vorliegenden Ergebnisse *in vivo* eine V_{1a} -Rezeptor-abhängige posttraumatische AQP1 Langzeithochregulation auf Transkriptions- und Proteinebene nach CCI im Mausmodell gezeigt werden.

Tierexperimentell wurde an Ratten eine reduzierte AQP1 Expression nach pharmakologischer Hemmung der JNK mit konsekutiven, neuroprotektiven Effekten gezeigt. Dazu zählten ein reduziertes Hirnödem, eine verminderte Schädigung der Blut-Hirn-Schranke sowie eine verbesserte neurologische Funktion (Yatsushige et al., 2007). Diese Ergebnisse sind konform zu den vorliegenden Ergebnissen und insbesondere daher interessant, weil Arginin-Vasopressin, wie bereits im Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben, eine Aktivierung der JNK auslöst. Die aktivierte JNK führt u.a. zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

mit Ausbildung eines vasogenen Hirnödems, so dass die V_{1a}-Rezeptor-abhängige posttraumatische AQP1 Langzeithochregulation gut erklärbar ist. JNK ist in der Pathophysiologie zahlreicher Hirnschädigungen wie Morbus Parkinson, Alzheimer-Demenz, Schlaganfall, Atherosklerose und Diabetes mellitus wesentlich. Zu beachten ist, dass die vollständige Hemmung der JNK das Zytoskelett zerstört und die Alzheimer-Demenz fortschreitet. Dagegen scheint eine selektive peptidische Hemmung der JNK nach ischämisch bedingtem Hirnschaden wahrscheinlich protektiv, wie in einer Übersichtsarbeit dargestellt wurde (Waetzig und Herdegen, 2005). Hieraus lässt sich also schließen, dass die V_{1a}-Rezeptor Deletion über eine verminderte JNK Aktivierung zu einem geringen vasogenen Hirnödem führt, wodurch die Hirndurchblutung im Bereich der Penumbra verbessert ist und konsekutiv auch ein geringeres zytotoxisches Hirnödem ausgelöst wird.

In vitro konnte eine Dexamethason-abhängige AQP1 mRNA Langzeithochregulation an zerebralen Mikrogefäßen der Ratte gezeigt werden. Bereits bekannt ist der anti-ödematöse Effekt von Glukokortikoiden in der Hirntumorthérapie. Dieser anti-ödematöse Effekt scheint über eine erhöhte AQP1 mRNA Expression auf zerebralen Mikrogefäßen vermittelt zu werden (Kobayashi et al., 2006).

4.2.3.5 Aquaporin 4

Aquaporin 4 ist der vorherrschende Wasserkanal im Gehirn und ist an den Grenzflächen der Hirnoberfläche, der Blut-Hirn- sowie Blut-Liquor-Schranke lokalisiert. Im Zusammenhang mit dem posttraumatischen Hirnwassertransport und der Hirnödementstehung ist die polar organisierte Lokalisation von AQP4 auf den perivaskulären Astrozyten Endfüßchen mit ihrem engen Kontakt zur Blut-Hirn-Schranke wesentlich (Nielsen et al., 1997; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Verkman et al., 2006; Yukutake und Yasui, 2010; Verkman, 2011) (Abbildung 41). Kobayashi et al. hat AQP4 unter physiologischen Bedingungen auf dem zerebrovaskulären Kapillarendothel von Ratten gefunden. (Kobayashi et al., 2001). Diese AQP4 Lokalisation ließ sich in dem verwendeten Mausmodell der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen und wäre nicht mit einer intakten Blut-Hirn-Schranke vereinbar.

AQP4 bildet in der Zellmembran sogenannte *Orthogonal Arrays of Particles* (OAP) (Landis und Reese, 1974; Verbavatz et al., 1997). Bisherige Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Wassertransportkapazität aufgrund dieser OAPs mit hoher AQP4 Dichte in der Zellmembran (Yang et al., 1996; Rash et al., 1998; Manley et al., 2000). Lange Zeit waren nur zwei AQP4 mRNA Isoformen bekannt: M1 und M23. Die Translation beider Isoformen startet jeweils an einer anderen Position von Methionin (Jung et al., 1994a; Neely et al., 1999). Die kurze Isoform M23 bildet große OAPs und resultiert möglicherweise in einer höheren Wasserpermeabilität, die lange Isoform M1 bildet isoliert keine OAPs (Silberstein et al., 2004). Auf Astrozyten Endfüßchen konnte eine Co-Lokalisation von M1 und M23 und dadurch bedingt, die Bildung mittelgroßer OAPs ermittelt werden. Möglicherweise wird so eine optimale Balance zwischen wirksamer perivaskulärer Lokalisation mit Nähe zur Blut-

Hirn-Schranke, effizienter Wassertransportkapazität sowie mögliche und schnelle AQP4 Internalisierung hergestellt (Furman et al., 2003). Neuere Studien weisen auf eine dritte, wesentlich längere Isoform hin: AQP4 Mz (Moe et al., 2008; Rossi et al., 2011; Sorbo et al., 2012). Die funktionellen Unterschiede der Isoformen sind bisher noch nicht hinreichend geklärt (Zelenina, 2010) und teilweise hinsichtlich der Wasserpermeabilität widersprüchlich. Eine frühere Untersuchung an Nierenepithelzellen beschreibt die höchste Wasserpermeabilität für die Isoform M23 (Silberstein et al., 2004). Dagegen zeigte eine neuere Untersuchung an *Xenopus Oozyten* eine signifikant unterschiedliche Wasserpermeabilität der einzelnen Isoformen und eine absteigende Wasserpermeabilität in der Reihenfolge M1, Mz und M23. Darüber hinaus werden alle 3 Isoformen unterschiedlich stark durch die PKC reguliert, wesentlich für die V_{1a} -Rezeptor-abhängige AQP4 Regulation. Keine der drei AQP4 Isoformen scheint für Osmolyte permeabel zu sein (Fenton et al., 2010).

Bisher kontrovers wird die AQP4 Wasserpermeabilität in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration diskutiert. Bekannt ist, dass das extrazelluläre Volumen nach neuronaler Aktivität durch Flüssigkeits- und Elektrolytaufnahme in die Gliazellen reduziert wird. In einem experimentellen Modell am N. opticus von Ratten führte eine alleinige Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration nicht zu einer Volumenreduktion des EZR (Ransom et al., 1985). Im sensomotorischen Kortex von Katzen wurde dagegen eine Kaliumionen induzierte EZR-Minderung beobachtet (Dietzel et al., 1980). Für AQP4 wird ein Kaliumionen-unabhängiger Wassertransport postuliert, da die Wasserpermeabilität von *Xenopus Oozyten* für alle AQP4 Isoformen M1, M23 und Mz unabhängig von der extrazellulären Kaliumionenkonzentration blieb (Fenton et al., 2010). Bekannt ist die Co-Lokalisation von AQP4 mit dem Kaliumionenkanal *inward rectifier*, Kir 4.1. Diese Co-Lokalisation ist mutmaßlich für den Wassertransport und die Ionenhomöostase von Bedeutung (Nagelhus et al., 1999; Amiry-Moghaddam et al., 2003b; Nagelhus et al., 2004; Soe et al., 2009; Masaki et al., 2010).

Tierexperimentelle Studien an AQP4 knock-out Mäusen haben eine Schlüsselrolle von AQP4 bei der Hirnödembildung gezeigt. AQP4 scheint das zytotoxische Hirnödem zu verstärken und das vasogene Hirnödem zu mindern. (Manley et al., 2000; Manley et al., 2004). Scheinbar spielt AQP4 also unter bestimmten Bedingungen beim zerebralen Wassereinstrom und auch beim Wasserabtransport eine zentrale Rolle. Neben dem Hirnwassertransport, ist AQP4 in diversen Hirnpathologien sowie für die Astrozytenmigration und neuronale Signaltransduktion von Bedeutung (Verkman et al., 2006; Yool, 2007; Verkman, 2011; Badaut et al., 2011).

Kurzzeitregulation

AQP4 hat diverse Phosphorylierungsstellen (Zelenina, 2010). Für die Kurzzeitregulation von AQP4 ist die Phosphorylierung von Serin 111 mit gesteigerter Wasserpermeabilität

wesentlich. Die Signaltransduktion erfolgt dafür über Glutamat, aktivierte NO-Synthase (NOS), NO-Freisetzung sowie über die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Bei zerebraler Ischämie, also auch posttraumatisch, ist Glutamat massiv erhöht, so dass eine erhöhte AQP4 Wasserpermeabilität resultiert (Gunnarson et al., 2008).

Arginin-Vasopressin (AVP) initiiert über die V_{1a} -Rezeptoren eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Serin 180, woraus eine verminderte Wasserpermeabilität von AQP4 folgt (Han et al., 1998; Zelenina et al., 2002; Moeller et al., 2009; McCoy et al., 2010).

Eine weitere und kurzfristige Proteinregulation ist über den Membraneinbau von in Vesikeln gespeicherten Proteinen bzw. deren Internalisierung möglich. Eine längerfristige Inkubation von *Xenopus Oozyten* mit PKC führt zur Internalisierung des Membranproteins AQP4, wie bereits im Abschnitt 4.2.1.3 dargestellt (Moeller et al., 2009). Dieser Mechanismus scheint zwar für AQP4 zu existieren (Carmosino et al., 2001; Carmosino et al., 2007), ist aber, im Gegensatz zu dem sehr viel schnelleren und bestens bekannten Mechanismus für AQP2 in den Hauptzellen der Niere, nicht wesentlich (Zelenina, 2010). Auch die vorliegenden *in vivo* Ergebnisse am Mausmodell sprechen auf Grund der kurzzeitigen posttraumatischen Hochregulation von AQP4 in Wildtyp Mäusen gegen die AQP4 Internalisierung. Möglicher kurzzeitiger Mechanismus nach CCI im Mausmodell könnte der AQP4 Einbau aus Vesikeln in die Zellmembran sein.

Ein weiterer Mechanismus der kurzfristigen Steigerung der AQP4 Wasserpermeabilität könnte durch die funktionelle Interaktion zwischen AQP4 und dem Kaliumionenkanal Kir 4.1 sowie dem $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Co-Transporter erklärbar sein. Nach experimentellem Schlaganfall am Mausmodell reduzierte die pharmakologische Hemmung des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Co-Transporters durch das Schleifendiuretikum Bumetanid das postischämische Hirnödem (Migliati et al., 2010). An *Xenopus Oozyten* hemmt Bumetanid nicht nur den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Co-Transporters, sondern auch AQP4 direkt (Migliati et al., 2009). Diese Hemmung von AQP4 durch Bumetanid könnte bereits ein möglicher Ansatz für die Entwicklung selektiver pharmakologischer AQP4 Inhibitoren sein.

Langzeitregulation

Die vorliegenden Ergebnisse ergaben eine konstitutive AQP4 mRNA Expression bis 24 Stunden nach CCI sowie eine kurzfristige periläsionale V_{1a} -Rezeptor-abhängige Hochregulation auf Proteinebene.

Zahlreiche Untersuchungen an AQP4 knock-out Mäusen haben die komplexe Bedeutung von AQP4 in Abhängigkeit der Hirnpathologie und der Ödemform bereits gezeigt (Badaut et al., 2011). Die tierexperimentelle Datenlage zur posttraumatischen AQP4 Langzeitregulation ist bisher kontrovers. An Ratten wurde sowohl eine erhöhte (Sun et al., 2003; Higashida et al., 2011; Tomura et al., 2011) als auch eine verminderte posttraumatische AQP4 Expression beobachtet (Ke et al., 2001; Kiening et al., 2002; Zhao et al., 2005). Gründe dafür sind, die Diversität der Methoden, der Verletzungsschwere, der Untersuchungszeitpunkte sowie der

untersuchten Hirnareale. Für die genaue AQP4 Langzeitanalyse ist dabei erschwerend, dass posttraumatisch ein kombiniertes Hirnödem vorliegt. Die Untersuchungen von AQP4 knock-out Mäusen haben gezeigt, dass AQP4 protektiv für das vasogene sowie aggravierend für das zytotoxische Hirnödem ist. AQP4 scheint also sowohl den zerebralen Wassereinstrom als auch den Wasserabtransport zu regulieren (Manley et al., 2000; Papadopoulos et al., 2004).

Die pharmakologische AQP4-Inhibition nach moderatem SHT an Ratten blieb bis 24 Stunden ebenfalls ohne Effekt auf das posttraumatische Hirnödem und ist zu unseren Ergebnissen konform (Oliva, Jr. et al., 2011). In einer weiteren Untersuchung auf Proteinebene wurde eine AQP4 Reduktion bis 48 Stunden nach CCI in beiden Hemisphären von Ratten beobachtet. Die AQP4 Expression war in der traumatisierten Hemisphäre deutlich abgefallen als in der nicht-traumatisierten Hemisphäre (Kiening et al., 2002). Möglicherweise ist die posttraumatische AQP4 Expression auch direkt von der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) abhängig. Im Bereich der Kontusion, also der Region des vasogenen Hirnödems mit defekter BHS, wurde eine verminderte AQP4 Expression nachgewiesen. Dagegen wurde im Bereich des diffusen Axonschadens und zytotoxischen Hirnödems mit intakter BHS eine unveränderte AQP4 Expression beobachtet (Ke et al., 2001). Eine weitere Untersuchung 24 und 72 Stunden nach penetrierendem SHT an Ratten konnte periläsional eine zytosolische AQP4 Erhöhung nachweisen, sodass eine *de novo* Synthese wahrscheinlich ist (Neal et al., 2007). Untersuchungen auf mRNA Ebene zeigten Unterschiede in der traumatisierten Hemisphäre. Periläsional war die AQP4 mRNA vermindert, dagegen in der gesamten traumatisierten Hemisphäre erhöht (Sun et al., 2003). Eine zweizeitige Läsion durch Hypoxie und Hypotension nach CCI an Ratten verstärkte die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, resultierte auch in einer verminderten AQP4 Hochregulation und einem erhöhtem Hirnwassergehalt (Taya et al., 2010).

Die posttraumatische, pharmakologische V_{1a} -Rezeptor Inhibition über einen Zeitraum von 5 Stunden führte zu einer reduzierten AQP4 Expression in der traumatisierten Hemisphäre von Ratten (Taya et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte 24 Stunden nach CCI eine reduzierte AQP4 mRNA bei den V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Eine definitive Aussage zur V_{1a} -Rezeptor-abhängigen AQP4 Langzeitregulation auf mRNA Ebene ist durch die vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

Die posttraumatische Krianiektomie an Ratten verminderte bis 48 Stunden nach induziertem Trauma den AQP4 Gehalt (Tomura et al., 2011). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass neben der Hirnödembildung auch der intrakranielle Druck und eine verminderte Perfusion mit Hypoxie für die AQP4 Expression relevant sind. Pharmakologische Inhibition von HIF-1 α reduzierte an Ratten ebenfalls die posttraumatische AQP4 Expression. Eine *in vitro* Untersuchung an Astrozyten von Ratten zeigte eine Hypoxie-

induzierte AQP4 mRNA Reduktion, die unter milder Hypothermie bei 32°C in einer zweifachen Erhöhung der AQP4 mRNA resultierte. Dies könnte unter anderem die neuroprotektiven Effekte der Hypothermie-Behandlung durch ein reduziertes Hirnödem erklären (Fujita et al., 2003).

Nach SAB war in AQP4 knock-out Mäusen das Hirnödem bei unveränderter Permeabilität der BHS verstärkt. Im Bereich der Glia limitans, Lokalisation der AQP4 Kanäle, war die Permeabilität durch Fehlen von AQP4 zweifach erniedrigt, sodass durch AQP4 Deletion eine verminderte posthämorrhagische Wasserelimination resultierte (Tait et al., 2010). In humanen Gewebeproben nach SAB wurde eine AQP4 Hochregulation auf reaktivierten Astrozyten sowie der Verlust der Polarität gefunden (Badaut et al., 2003).

Nach experimentellem ischämischem Schlaganfall (MCAo) bei Ratten wurde eine erhöhte AQP4 mRNA Expression in der angrenzenden Infarktregion über einen Zeitraum von sieben Tagen, mit einem Maximum am dritten postischämischen Tag, detektiert. Dabei korrelierte der AQP4 mRNA Gehalt mit der Hirnödembildung bzw. -resolution (Taniguchi et al., 2000).

Zusammenfassend scheint insbesondere die AQP4 Langzeitregulation von zahlreichen Mechanismen beeinflusst zu werden, sodass weitere Untersuchungen mit genauer Definition des untersuchten Hirnareals erforderlich sind.

4.2.3.6 Aquaporin 9

AQP9 gehört zur Gruppe der Aquaglyceroporine, die neben Wasser auch Glycerol, Harnstoff und Monocarboxylate transportieren und wurde sowohl im Ratten- (Elkjaer et al., 2000) als auch im Maushirn detektiert (Badaut et al., 2001). Bisher wurde AQP9 auf katecholaminergen Neuronen, Astrozyten und Tanyzyten nachgewiesen. Tanyzyten bilden das spezialisierte Ependym der zirkumventrikulären Organe mit fenestriertem Epithel und damit fehlender Blut-Hirn-Schranke. Die Lokalisation auf diesen Tanyzyten spricht für eine Funktion und Bedeutung von AQP9 in der zentralen Osmoregulation (Nicchia et al., 2001; Badaut et al., 2001; Badaut et al., 2004). Neben der Funktion der Wasserhomöostase ist AQP9 am Energiemetabolismus des ZNS mutmaßlich beteiligt (Elkjaer et al., 2000; Badaut et al., 2001; Badaut und Regli, 2004; Badaut et al., 2004; Badaut et al., 2007; Badaut et al., 2008). Bisher werden im Gehirn zwei Isoformen für AQP9 unterschieden. Die lange Isoform ist in der Zellplasmamembran lokalisiert. Die kurze Isoform wurde in der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen. Mitochondriales AQP9 passt möglicherweise über die Laktatkonzentration im extramitochondrialen Zytoplasma den Energiemetabolismus an den Bedarf der Zelle an (Amiry-Moghaddam et al., 2005).

Kurzzeitregulation

AQP9 verfügt über 3 verschiedene Phosphorylierungsstellen. Davon hat nur die Position Threonin 26 eine funktionelle Bedeutung und ist sowohl in humanem, murinen und Rattengewebe konserviert. Aussagen zur Kurzzeit-Regulation von AQP9 sind bezüglich

PKC-abhängiger Phosphorylierung divers (Zelenina, 2010). Plausible Untersuchungen an *Xenopus Oozyten* haben für AQP9 keine signifikante PKC Sensitivität hinsichtlich veränderter Wasserpermeabilität und Membranlokalisation ermittelt (Moeller et al., 2009).

Langzeitregulation

Bisher fehlen ausreichende Untersuchungen der molekularen AQP9 Langzeit-Regulation *in vivo* (Badaut, 2010). *In vitro* wurde an Astrozyten eine PKC-abhängige Downregulation und eine PKA-abhängige Hochregulation nachgewiesen (Yamamoto et al., 2001a; Yamamoto et al., 2002). Posttraumatisch unterlag AQP9 auf Transkriptionsebene sowohl in Wildtyp als auch V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen keiner Regulation, wie die vorliegende Untersuchung ergab.

Möglicherweise könnte das Ergebnis durch AQP9 mRNA von Leukozyten aus der posttraumatischen Blutung beeinflusst sein. Eine weitere Hypothese könnte eine kurzfristige gegensätzliche Regulation von AQP9 sein. In einer Astrozytenkultur reduzierte eine Hypoxie initial die AQP9 Expression. Diese Reduktion wurde von einer Überexpression nach Reoxygenierung abgelöst (Yamamoto et al., 2001b). Dieser Mechanismus könnte möglicherweise dazu führen, dass die Quantifizierung der AQP9 mRNA bis 24 Stunden nach CCI sowohl im Wildtyp als auch Knock-out in den vorliegenden Ergebnissen unverändert blieb. An Ratten wurde nach geschlossenem Schädel-Hirntrauma eine HIF-1 α -abhängige AQP9 Hochregulation detektiert (Ding et al., 2009), denkbare Ursache für die postischämische Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke (Ogunshola und Al-Ahmad, 2012). HIF-1 α ist als wesentlicher Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit des Sauerstoffgehaltes der Zelle bekannt (Giaccia et al., 2003). Weitere Regulationsmechanismen scheinen Osmolarität und Glukokortikoide zu sein, da die AQP9 Promotorregion diesbezüglich über Bindungsstellen verfügt (Tsukaguchi et al., 1999). Im Rattenhirn konnte durch Insulinmangel eine AQP9 Hochregulation nur in katecholaminergen Neuronen nachgewiesen werden, denkbarer Hinweis für die Bedeutung von AQP9 im Energiemetabolismus (Badaut et al., 2008).

4.2.4 Schlussfolgerung und klinische Bedeutung

Die vorliegenden experimentellen Untersuchungen an V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen haben gezeigt, dass die Inhibition des V_{1a} -Rezeptors das posttraumatische Hirnödem, den sekundären Hirnschaden und den posttraumatischen Gewichtsverlust reduziert und die neurologische Funktion signifikant verbessert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die gezeigten anti-ödematösen Effekte im V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell unter anderem über Aquaporine vermittelt werden. Dabei korreliert die AQP1 und AQP4 Regulation im Hirnparenchym mit der Bildung des posttraumatischen Hirnödems. Die Aquaporine 1 und 4 unterliegen sowohl einer kurz- als auch langfristigen V_{1a} -Rezeptor-abhängigen Regulation. Folglich scheint eine verstärkte Expression von AQP1 und AQP4

der Mechanismus des durch V_{1a} -Rezeptoren vermittelten Hirnödems zu sein. Damit ist der V_{1a} -Rezeptor ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt für die Prävention des posttraumatischen Hirnödems. Aus diesen Ergebnissen resultiert auch, dass die Indikation für den Einsatz von Vasopressin bei Patienten mit Schädel-Hirntrauma äußerst streng gestellt werden und möglichst vermieden werden sollte.

Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten

Die Entwicklung von Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten geht auf Sawyer und Manning zurück (Sawyer und Manning, 1973; Sawyer und Manning, 1984). Da peptidische Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten teuer, nur schwach wirksam und oral nicht applizierbar sind (Lemmens-Gruber und Kamyar, 2008), ist die Entwicklung nicht-peptidischer selektiver zerebral wirksamer Vasopressin V_{1a} -Rezeptor-Antagonisten erforderlich. Bisher ist Conivaptan, ein nicht-selektiver V_{1a}/V_2 -Rezeptor-Antagonist, für die vorübergehende, stationäre Behandlung der Hyponatriämie zugelassen (Cawley, 2007). In der neurointensivmedizinischen Versorgung ist Conivaptan zur Vermeidung von Hyponatriämie-bedingten epileptischen Anfällen und Hirnödem wirksam (Wright et al., 2009; Murphy et al., 2009; Walcott et al., 2012). Entgegen der Erwartung verändert Conivaptan weder den systolischen Blutdruck noch die Herzfrequenz (Walcott et al., 2012).

Relcovaptan, ein selektiver nicht-peptidischer V_{1a} -Rezeptor-Antagonist konnte bisher periphere Effekte bei Morbus Raynaud, Tokolyse und Dysmenorrhö zeigen (Brouard et al., 2000; Hayoz et al., 2000; Decaux et al., 2008; Lemmens-Gruber und Kamyar, 2008). Für die klinische Etablierung einer V_{1a} -Rezeptor-vermittelten neuroprotektiven Therapie des posttraumatischen sekundären Hirnschadens ist neben Großtierstudien und klinischen Studien, insbesondere die Entwicklung selektiver, zerebral wirksamer V_{1a} -Rezeptor-Antagonisten anzustreben.

Aquaporin-Inhibitoren

Ein weiterer klinischer Ansatz ist die pharmakologische selektive, nicht-toxische Inhibition von Aquaporin 1 und 4, deren Bedeutung in der Pathophysiologie des Hirnödems offensichtlich ist. Bisher konnte AqB013, ein Arylsulphonamid, als Inhibitor für AQP1 und AQP4 entwickelt werden (Yool et al., 2010). Die mutmaßliche Bindungsstelle von AqB013 liegt intrazellulär an jeweils zwei Aminosäuren des Loop D, verantwortlich für das *Gating* des Wasserkanals. AqB013 verschließt AQP1 durch Bindung an die Aminosäuren Arginin 159 und Alanin 168 in Loop D. Bindungsstellen von AqB013 an AQP4 der Ratte bzw. humanem Gewebe sind Serin 180 und Valin 189 bzw. Serin 180 und Isoleucin 189 (Migliati et al., 2009; Yool et al., 2010).

Kürzlich wurde siRNA zur Hemmung von AQP4 eingesetzt. Es wurde eine Reduktion der AQP4 Expression von ca. 30% erreicht. Die Wasserpermeabilität wurde durch einen Diffusionsquotienten, dem sogenannten *Apparent Diffusion Coefficient* (ADC) nachgewiesen

(Badaut et al., 2010). Dieses Verfahren ist jedoch für den klinischen Einsatz und die AQP4 Hemmung noch nicht ausreichend erforscht.

Zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie des posttraumatischen Hirnödems sind weitere Studien an AQP1 und AQP4 knock-out Mäusen erforderlich. Um die Langzeiteffekte durch pharmakologische Hemmung von AQP1 und AQP4 mit AqB013 bzw. durch siRNA nach Schädel-Hirntrauma zu evaluieren und das Nebenwirkungsprofil der AQP1 und 4 Inhibition zu ermitteln, sind weitere *in vivo* Studien notwendig. Darüber hinaus ist die Entwicklung selektiver AQP Inhibitoren unbedingt zu empfehlen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Schädel-Hirntrauma (SHT) ist bei Kindern und jungen Erwachsenen bis zum 45. Lebensjahr mit einer Inzidenz von 332 Verletzten pro 100.000 Einwohner in Deutschland die häufigste Krankheits- und Todesursache. Neben dem persönlichen Leiden und der hohen Rate an posttraumatischer Pflegebedürftigkeit, sollte auch die sozioökonomische Tragweite mit, allein in Deutschland, gesamtgesellschaftlichen Kosten von 2,8 Milliarden Euro pro Jahr berücksichtigt werden.

Die Pathophysiologie des SHT verläuft zweizeitig. Während der Primärschaden durch die mechanische Krafteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn einer Behandlung nicht zugänglich ist, kann der sogenannte Sekundärschaden als Folge resultierender Komplikationen betrachtet werden. Hauptprädiktor für ein schlechtes Ergebnis der Patienten sind posttraumatisches Hirnödem und der intrakranielle Druckanstieg. Durch zerebrale Minderperfusion und Ischämie entsteht ein Circulus vitiosus mit progredientem, vasogenem und zytotoxischem Hirnödem. Kann eine anti-ödematöse und hirndrucksenkende Therapie nicht frühzeitig etabliert werden, erliegt in der sogenannten *Penumbra* nicht nur der Funktionsstoffwechsel, sondern schließlich auch der Strukturstoffwechsel. Folge ist ein vergrößerter Sekundärschaden, der initial einer Therapie prinzipiell zugänglich wäre. Trotz intensiver Forschung fehlt weiterhin eine kausale Therapie, die das posttraumatische Hirnödem zu einem möglichst frühen Zeitpunkt mindern könnte.

Vasopressin und V_{1a} -Rezeptoren scheinen eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie von Hirnschädigungen zu spielen. Einerseits korreliert die Höhe des Vasopressin-Serumspiegels positiv mit der Schwere von unterschiedlichen Hirnläsionen und andererseits mindert die pharmakologische Hemmung des V_{1a} -Rezeptors sowohl nach fokaler Ischämie als auch nach SHT das Hirnödem und den sekundären Hirnschaden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von Vasopressin V_{1a} -Rezeptoren und Aquaporinen auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem SHT an einem hochspezifischen V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell zu untersuchen; Grundlage für die Entwicklung möglicher, bisher fehlender, kausaler, neuroprotektiver, pharmakologischer Therapieansätze.

Im ersten Abschnitt der experimentellen Untersuchungen an V_{1a} -Rezeptor knock-out Mäusen konnte erstmals gezeigt werden, dass die V_{1a} -Rezeptor Gendeletion das posttraumatische Hirnödem, den sekundären Hirnschaden und den posttraumatischen Gewichtsverlust reduziert sowie die neurologische Funktion signifikant verbessert. Durch die Validierung des V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodells hinsichtlich der physiologischen Parameter MAP, ICP und CBF hängen diese neuroprotektiven Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht von vaskulären oder systemischen Effekten ab. Welche intrazellulären und molekularen Regulationsmechanismen diesen neuroprotektiven Effekten zugrunde liegen, ist weitestgehend unklar. Daher sollte durch diese Arbeit untersucht werden, ob die gezeigten

anti-ödematösen, posttraumatischen Effekte durch die V_{1a} -Rezeptor Deletion im Mausmodell über Aquaporine vermittelt werden.

Bekannt ist, dass das Gehirn auf ein wirksames Volumen- und Ionen-Gleichgewicht seiner vier Flüssigkeitskompartimente angewiesen ist. Ein hochspezifischer, schneller und bidirektionaler Wassertransport über die lipophile Zellmembran erfolgt über Wasserkanäle, die sogenannten Aquaporine (AQP). Während die systemische Regulation der Wasserhomöostase über den Vasopressin V_2 -Rezeptor-abhängigen Einbau von AQP2 im Sammelrohr der Niere sehr gut bekannt ist, ist sowohl die zentrale Funktion von Vasopressin als auch die Regulation zerebraler Aquaporine wenig verstanden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden erstmals für die im Maushirn relevanten zerebralen AQP1, 4 und 9 spezifische Primer entwickelt. Dies war die wesentliche Voraussetzung für die quantitative AQP1, 4 und 9 Analyse auf Transkriptionsebene im zeitlichen Verlauf nach CCI.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit konnte erstmals auf Transkriptionsebene gezeigt werden, dass AQP1 V_{1a} -Rezeptor-abhängig an der posttraumatischen Hirnödementstehung beteiligt ist. Die AQP4 mRNA wurde 6 und 24 Stunden nach CCI auf Transkriptionsebene V_{1a} -Rezeptor-abhängig konstitutiv exprimiert. AQP9 unterlag auf mRNA Ebene bis 24 Stunden nach CCI keiner V_{1a} -Rezeptor-abhängigen posttraumatischen Regulation.

Im vierten und letzten Abschnitt wurde AQP1 und AQP4 auf Proteinebene lokalisiert und im zeitlichen Verlauf nach CCI quantifiziert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass AQP1 im Maushirn nicht nur auf dem Epithel des Plexus choroideus, sondern auch weit verbreitet auf Neuronen im Kortex, Hippocampus und auf neuronalen Fasersystemen exprimiert wird. Posttraumatisch wurde AQP1 in der kontralateralen Hemisphäre V_{1a} -Rezeptor-abhängig kurz- und langfristig reguliert.

AQP4 wurde ubiquitär auf kortikalen und subkortikalen Gliazellen, insbesondere auch auf den perivaskulären Astrozyten Endfüßchen und auf der Kortexoberfläche im Bereich der Meningen detektiert. AQP4 unterlag periläsional einer V_{1a} -Rezeptor-abhängigen kurzzeitigen Hochregulation und wurde 24 Stunden nach CCI wieder auf die Ausgangswerte herunterreguliert.

Da für AQP9 bisher noch kein spezifischer Antikörper für *in vivo* Untersuchungen nach CCI entwickelt werden konnte, sind valide Ergebnisse für die AQP9 Untersuchungen auf Proteinebene noch ausstehend.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der V_{1a} -Rezeptor ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt für die Prävention und Reduktion des posttraumatischen Hirnödems ist. Aus den Ergebnissen resultiert auch, dass die Indikation für den Einsatz von Vasopressin bei Patienten mit Schädel-Hirntrauma äußerst streng gestellt werden und möglichst vermieden werden sollte. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass diese anti-ödematösen Effekte im V_{1a} -Rezeptor knock-out Mausmodell unter anderem über Aquaporine vermittelt

werden. Dabei korreliert die AQP1 und AQP4 Regulation im Hirnparenchym mit der Bildung des posttraumatischen Hirnödems. AQP1 und AQP4 unterliegen sowohl einer kurz- als auch langfristigen V_{1a} -Rezeptor-abhängigen Regulation.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams,J.H., Doyle,D., Ford,I., Gennarelli,T.A., Graham,D.I., and McLellan,D.R. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 15[1], 49-59. 1989.
2. Adams,J.H., Graham,D.I., Murray,L.S., and Scott,G. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases. *Ann. Neurol.* 12[6], 557-563. 1982.
3. Agre,P., Preston,G.M., Smith,B.L., Jung,J.S., Raina,S., Moon,C., Guggino,W.B., and Nielsen,S. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol* 265[4 Pt 2], F463-F476. 1993.
4. Albert-Weissenberger,C. and Siren,A.L. Experimental traumatic brain injury. *Exp. Transl. Stroke Med.* 2[1], 16. 2010.
5. Albertini,R. and Bianchi,R. Aquaporins and glia. *Curr. Neuropharmacol.* 8[2], 84-91. 2010.
6. Allen,F.J. The Mechanism of Contre-Coup and of Certain Other Forms of Intracranial Injury. *Br. Med. J.* 1[1846], 1196-1197. 1896.
7. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215[3], 403-410. 1990.
8. Amiry-Moghaddam,M., Lindland,H., Zelenin,S., Roberg,B.A., Gundersen,B.B., Petersen,P., Rinvik,E., Torgner,I.A., and Ottersen,O.P. Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane. *FASEB J.* 19[11], 1459-1467. 2005.
9. Amiry-Moghaddam,M., Otsuka,T., Hurn,P.D., Traystman,R.J., Haug,F.M., Froehner,S.C., Adams,M.E., Neely,J.D., Agre,P., Ottersen,O.P., and Bhargava,A. An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100[4], 2106-2111. 2003a.
10. Amiry-Moghaddam,M. and Ottersen,O.P. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4[12], 991-1001. 2003.
11. Amiry-Moghaddam,M., Williamson,A., Palomba,M., Eid,T., de Lanerolle,N.C., Nagelhus,E.A., Adams,M.E., Froehner,S.C., Agre,P., and Ottersen,O.P. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100[23], 13615-13620. 2003b.
12. Andrews,P.J., Piper,I.R., Dearden,N.M., and Miller,J.D. Secondary insults during intrahospital transport of head-injured patients. *Lancet* 335[8685], 327-330. 1990.
13. Andrews,P.J., Sleeman,D.H., Statham,P.F., McQuatt,A., Corruble,V., Jones,P.A., Howells,T.P., and Macmillan,C.S. Predicting recovery in patients suffering from traumatic brain injury by using admission variables and physiological data: a comparison between decision tree analysis and logistic regression. *J. Neurosurg.* 97[2], 326-336. 2002.
14. Andriessen,T.M., Jacobs,B., and Vos,P.E. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J. Cell Mol. Med.* 14[10], 2381-2392. 2010.
15. Anthony,T.L., Brooks,H.L., Boassa,D., Leonov,S., Yanochko,G.M., Regan,J.W., and Yool,A.J. Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 57[3], 576-588. 2000.
16. Arcienega,I.I., Brunet,J.F., Bloch,J., and Badaut,J. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience* 167[4], 1103-1114. 2010.
17. Armbrrecht,M. Photometrie-Leitfaden. Eppendorf AG 29, 12-13. 2008.
18. Astrup,J., Siesjo,B.K., and Symon,L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12[6], 723-725. 1981.
19. Badaut,J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* 168[4], 1047-1057. 2010.

20. Badaut,J., Ashwal,S., Adami,A., Tone,B., Recker,R., Spagnoli,D., TERNON,B., and Obenaus,A. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference. *J. Cereb. Blood Flow Metab* . 2010.
21. Badaut,J., Ashwal,S., and Obenaus,A. Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovasc. Dis.* 31[6], 521-531. 2011.
22. Badaut,J., Brunet,J.F., Grollmund,L., Hamou,M.F., Magistretti,P.J., Villemure,J.G., and Regli,L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir. Suppl* 86, 495-498. 2003.
23. Badaut,J., Brunet,J.F., Petit,J.M., Guerin,C.F., Magistretti,P.J., and Regli,L. Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats. *Brain Res.* 1188, 17-24. 2008.
24. Badaut,J., Brunet,J.F., and Regli,L. Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct". *Metab Brain Dis.* 22[3-4], 251-263. 2007.
25. Badaut,J., Hirt,L., Granziera,C., Bogousslavsky,J., Magistretti,P.J., and Regli,L. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21[5], 477-482. 2001.
26. Badaut,J., Lasbennes,F., Magistretti,P.J., and Regli,L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 22[4], 367-378. 2002.
27. Badaut,J., Petit,J.M., Brunet,J.F., Magistretti,P.J., Charriat-Marlangue,C., and Regli,L. Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* 128[1], 27-38. 2004.
28. Badaut,J. and Regli,L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience* 129[4], 971-981. 2004.
29. Badruddin,A., Taqi,M.A., Abraham,M.G., Dani,D., and Zaidat,O.O. Neurocritical care of a reperfused brain. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11[1], 104-110. 2011.
30. Baethmann,A., Eriskat,J., Stoffel,M., Chapuis,D., Wirth,A., and Plesnila,N. Special aspects of severe head injury: recent developments. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 11[2], 193-200. 1998a.
31. Baethmann,A., Lehr,D., and Wirth,A. Prospective analysis of patient management in severe head injury. *Acta Neurochir. Suppl* 71, 107-110. 1998b.
32. Baethmann,A., Wirth,A., and Schlesinger-Raab,A. Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur. Surg. Res.* 34[1-2], 42-46. 2002.
33. Barberis,C., Mouillac,B., and Durroux,T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J. Endocrinol.* 156[2], 223-229. 1998.
34. Bargmann,W. and Scharrer E. The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am. Sci.* 39, 255-259. 1951.
35. Barreca,T., Gandolfo,C., Corsini,G., Del,S.M., Cataldi,A., Rolandi,E., and Franceschini,R. Evaluation of the secretory pattern of plasma arginine vasopressin in stroke patients. *Cerebrovasc. Dis.* 11[2], 113-118. 2001.
36. Barzo,P., Marmarou,A., Fatouros,P., Corwin,F., and Dunbar,J. Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 85[6], 1113-1121. 1996.
37. Bhardwaj,A.R., Pandey,R., Agarwal,M., and Katiyar-Agarwal,S. Northern blot analysis for expression profiling of mRNAs and small RNAs. *Methods Mol. Biol.* 883, 19-45. 2012.
38. Birnbaumer,M. Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab* 11[10], 406-410. 2000.
39. Boassa,D. and Yool,A.J. Physiological roles of aquaporins in the choroid plexus. *Curr. Top. Dev. Biol.* 67, 181-206. 2005.

40. Böcker,W., Denk,H., Heitz,Ph.U., and Moch,H. Pathologie. Urban & Fischer München, Jena 4. vollständig überarbeitete Auflage, "Spickzettel Pathologie". 2008.
41. Bossis,G., Malnou,C.E., Farras,R., Andermarcher,E., Hipskind,R., Rodriguez,M., Schmidt,D., Muller,S., Jariel-Encontre,I., and Piechaczyk,M. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol. Cell Biol.* 25[16], 6964-6979. 2005.
42. Bouma,G.J. and Muizelaar,J.P. Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J. Neurotrauma* 9 Suppl 1, S333-S348. 1992.
43. Bouma,G.J., Muizelaar,J.P., Bando,K., and Marmarou,A. Blood pressure and intracranial pressure-volume dynamics in severe head injury: relationship with cerebral blood flow. *J. Neurosurg.* 77[1], 15-19. 1992.
44. Bourke,R.S., Kimelberg,H.K., Nelson,L.R., Barron,K.D., Auen,E.L., Popp,A.J., and Waldman,J.B. Biology of glial swelling in experimental brain edema. *Adv. Neurol* 28, 99-109. 1980.
45. Bourque,C.W. and Oliet,S.H. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol* 59, 601-619. 1997.
46. Brain Trauma Foundation, AANS, and CNS Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24 Suppl 1, S1-106. 2007.
47. Brouard,R., Bossmar,T., Fournie-Lloret,D., Chassard,D., and Akerlund,M. Effect of SR49059, an orally active V1a vasopressin receptor antagonist, in the prevention of dysmenorrhoea. *BJOG.* 107[5], 614-619. 2000.
48. Bruch H.-P. and Trentz O. *Berchold Chirurgie.* Urban & Fischer, 6. Auflage , 1173. 2008a.
49. Bruch H.-P. and Trentz O. *Berchold Chirurgie.* Urban & Fischer; 6. Auflage , 1166. 2008b.
50. Buijs,R.M. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192[3], 423-435. 1978.
51. Buijs,R.M., Swaab,D.F., Dogterom,J., and van Leeuwen,F.W. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* 186[3], 423-433. 1978.
52. Bullock,R. Pathophysiological alterations in the central nervous system due to trauma. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 123[11], 449-458. 1993.
53. Bullock,R., Zauner,A., Myseros,J.S., Marmarou,A., Woodward,J.J., and Young,H.F. Evidence for prolonged release of excitatory amino acids in severe human head trauma. Relationship to clinical events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 765, 290-297. 1995.
54. Bullock,R., Zauner,A., Woodward,J.J., Myseros,J., Choi,S.C., Ward,J.D., Marmarou,A., and Young,H.F. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J. Neurosurg.* 89[4], 507-518. 1998.
55. Bustin,S.A., Beaulieu,J.F., Huggett,J., Jaggi,R., Kibenge,F.S., Olsvik,P.A., Penning,L.C., and Toegel,S. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC. Mol. Biol.* 11, 74. 2010.
56. Bustin,S.A. and Nolan,T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15[3], 155-166. 2004.
57. Campbell,E.M., Birdsell,D.N., and Yool,A.J. The activity of human aquaporin 1 as a cGMP-gated cation channel is regulated by tyrosine phosphorylation in the carboxyl-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 81[1], 97-105. 2012.
58. Carbonell,W.S., Maris,D.O., McCall,T., and Grady,M.S. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J. Neurotrauma* 15[3], 217-229. 1998.
59. Carbrey,J.M. and Agre,P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb. Exp. Pharmacol.* [190], 3-28. 2009.

60. Carbrejy,J.M., Gorelick-Feldman,D.A., Kozono,D., Praetorius,J., Nielsen,S., and Agre,P. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100[5], 2945-2950. 2003.
61. Carmosino,M., Procino,G., Nicchia,G.P., Mannucci,R., Verbavatz,J.M., Gobin,R., Svelto,M., and Valenti,G. Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells. *J. Cell Biol.* 154[6], 1235-1243. 2001.
62. Carmosino,M., Procino,G., Tamma,G., Mannucci,R., Svelto,M., and Valenti,G. Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells. *Biol. Cell* 99[1], 25-36. 2007.
63. Cawley,M.J. Hyponatremia: current treatment strategies and the role of vasopressin antagonists. *Ann. Pharmacother.* 41[5], 840-850. 2007.
64. Chesnut,R.M., Marshall,L.F., Klauber,M.R., Blunt,B.A., Baldwin,N., Eisenberg,H.M., Jane,J.A., Marmarou,A., and Foulkes,M.A. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J. Trauma* 34[2], 216-222. 1993.
65. Chodobski,A., Loh,Y.P., Corsetti,S., Szmydynger-Chodobska,J., Johanson,C.E., Lim,Y.P., and Monfils,P.R. The presence of arginine vasopressin and its mRNA in rat choroid plexus epithelium. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48[1], 67-72. 1997.
66. Chou,Q., Russell,M., Birch,D.E., Raymond,J., and Bloch,W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 20[7], 1717-1723. 1992.
67. Cintra,E.A., Maciel,J.A., Jr., Araujo,S., Castro,M., Martins,E.F., Falcao,A.L., Sardinha,L.A., Terzi,R.G., Dragosavac,D., Cardoso,A.P., and Oliveira,R.A. Vasopressin serum levels in patients with severe brain lesions and in brain-dead patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 62[2A], 226-232. 2004.
68. Clifton,G.L., Miller,E.R., Choi,S.C., and Levin,H.S. Fluid thresholds and outcome from severe brain injury. *Crit Care Med.* 30[4], 739-745. 2002.
69. Corrigan,J.D., Selassie,A.W., and Orman,J.A. The epidemiology of traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 25[2], 72-80. 2010.
70. Cserr,H.F. and Latzkovits,L. A role for centrally-released vasopressin in brain ion and volume regulation: a hypothesis. *Prog. Brain Res.* 91, 3-6. 1992.
71. Decaux,G., Soupart,A., and Vassart,G. Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. *Lancet* 371[9624], 1624-1632. 2008.
72. Deen,P.M., Dempster,J.A., Wieringa,B., and Van Os,C.H. Isolation of a cDNA for rat CHIP28 water channel: high mRNA expression in kidney cortex and inner medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188[3], 1267-1273. 1992.
73. Deen,P.M., Verdijk,M.A., Knoers,N.V., Wieringa,B., Monnens,L.A., Van Os,C.H., and van Oost,B.A. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264[5155], 92-95. 1994.
74. Del Bigio,M.R. and Fedoroff,S. Swelling of astroglia in vitro and the effect of arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* 51, 14-16. 1990.
75. Denny-Brown,D.E. and Russell,W.R. Experimental Concussion: (Section of Neurology). *Proc. R. Soc. Med.* 34[11], 691-692. 1941.
76. DePasquale,M., Patlak,C.S., and Cserr,H.F. Brain ion and volume regulation during acute hypernatremia in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol* 256[6 Pt 2], F1059-F1066. 1989.
77. Derks,N.M., Muller,M., Gaszner,B., Tilburg-Ouwens,D.T., Roubos,E.W., and Kozicz,L.T. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156[2], 305-309. 2008.
78. DGN. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: Hirndruck. 2008.

79. DGNC. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie: Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. 2006.
80. Dheda,K., Huggett,J.F., Bustin,S.A., Johnson,M.A., Rook,G., and Zumla,A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37[1], 112-119. 2004.
81. Dietzel,I., Heinemann,U., Hofmeier,G., and Lux,H.D. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp. Brain Res.* 40[4], 432-439. 1980.
82. Ding,J.Y., Kreipke,C.W., Speirs,S.L., Schafer,P., Schafer,S., and Rafols,J.A. Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* 453[1], 68-72. 2009.
83. Dixon,C.E., Lyeth,B.G., Povlishock,J.T., Findling,R.L., Hamm,R.J., Marmarou,A., Young,H.F., and Hayes,R.L. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J. Neurosurg.* 67[1], 110-119. 1987.
84. Doczi,T. Volume regulation of the brain tissue--a survey. *Acta Neurochir. (Wien.)* 121[1-2], 1-8. 1993.
85. Doczi,T., Laszlo,F.A., Szerdahelyi,P., and Joo,F. Involvement of vasopressin in brain edema formation: further evidence obtained from the Brattleboro diabetes insipidus rat with experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 14[4], 436-441. 1984.
86. Donkin,J.J. and Vink,R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr. Opin. Neurol.* 23[3], 293-299. 2010.
87. Egashira,N., Tanoue,A., Matsuda,T., Koushi,E., Harada,S., Takano,Y., Tsujimoto,G., Mishima,K., Iwasaki,K., and Fujiwara,M. Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav. Brain Res.* 178[1], 123-127. 2007.
88. Elf,K., Nilsson,P., Ronne-Engstrom,E., Howells,T., and Enblad,P. Cerebral perfusion pressure between 50 and 60 mm Hg may be beneficial in head-injured patients: a computerized secondary insult monitoring study. *Neurosurgery* 56[5], 962-971. 2005.
89. Elkjaer,M., Vajda,Z., Nejsum,L.N., Kwon,T., Jensen,U.B., miry-Moghaddam,M., Frokiaer,J., and Nielsen,S. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276[3], 1118-1128. 2000.
90. Faraci,F.M., Mayhan,W.G., Farrell,W.J., and Heistad,D.D. Humoral regulation of blood flow to choroid plexus: role of arginine vasopressin. *Circ. Res.* 63[2], 373-379. 1988.
91. Fenton,R.A. and Moeller,H.B. Recent discoveries in vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Prog. Brain Res.* 170, 571-579. 2008.
92. Fenton,R.A., Moeller,H.B., Zelenina,M., Snaebjornsson,M.T., Holen,T., and Macaulay,N. Differential water permeability and regulation of three aquaporin 4 isoforms. *Cell Mol. Life Sci.* 67[5], 829-840. 2010.
93. Finkelstein,A. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes: theory and reality. Wiley, New York . 1987.
94. Fishman,R.A. Cell volume, pumps, and neurologic function: brain's adaptation to osmotic stress. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 53, 159-171. 1974.
95. Flierl,M.A., Stahel,P.F., Beauchamp,K.M., Morgan,S.J., Smith,W.R., and Shohami,E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat. Protoc.* 4[9], 1328-1337. 2009.
96. Fog,M. The relationship between the blood pressure and the tonic regulation of the pial arteries. *J.Neurol Psychiatry* 1[3], 187-197. 1938.
97. Folkesson,H.G., Matthay,M.A., Hasegawa,H., Kheradmand,F., and Verkman,A.S. Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91[11], 4970-4974. 1994.
98. Forbes,H.S. and Nason,G.I.W.R.C. Cerebral circulation: vasodilation in the pia following stimulation of the vagus, aortic and carotid sinus nerves. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* 37, 334-350. 1937.

99. Fujita,Y., Yamamoto,N., Sobue,K., Inagaki,M., Ito,H., Arima,H., Morishima,T., Takeuchi,A., Tsuda,T., Katsuya,H., and Asai,K. Effect of mild hypothermia on the expression of aquaporin family in cultured rat astrocytes under hypoxic condition. *Neurosci. Res.* 47[4], 437-444. 2003.
100. Furman,C.S., Gorelick-Feldman,D.A., Davidson,K.G., Yasumura,T., Neely,J.D., Agre,P., and Rash,J.E. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100[23], 13609-13614. 2003.
101. Gentry,L.R. Imaging of closed head injury. *Radiology* 191[1], 1-17. 1994.
102. Gentry,L.R., Godersky,J.C., and Thompson,B. MR imaging of head trauma: review of the distribution and radiopathologic features of traumatic lesions. *AJR Am. J. Roentgenol.* 150[3], 663-672. 1988.
103. Giaccia,A., Siim,B.G., and Johnson,R.S. HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2[10], 803-811. 2003.
104. Goggio,A.F. The mechanismen of contre-coup injury. *J Neurol Psychiatry* 4[1], 11-12. 1941.
105. Gonen,T. and Walz,T. The structure of aquaporins. *Q. Rev. Biophys.* 39[4], 361-396. 2006.
106. Gorelick,D.A., Praetorius,J., Tsunenari,T., Nielsen,S., and Agre,P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC. Biochem.* 7, 14. 2006.
107. Graham,D.I., Adams,J.H., and Doyle,D. Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J. Neurol. Sci.* 39[2-3], 213-234. 1978.
108. Greve,M.W. and Zink,B.J. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt. Sinai J. Med.* 76[2], 97-104. 2009.
109. Gullans,S.R. and Verbalis,J.G. Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions. *Annu. Rev. Med.* 44, 289-301. 1993.
110. Gunnarson,E., Zelenina,M., and Aperia,A. Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience* 129[4], 947-955. 2004.
111. Gunnarson,E., Zelenina,M., Axehult,G., Song,Y., Bondar,A., Krieger,P., Brismar,H., Zelenin,S., and Aperia,A. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* 56[6], 587-596. 2008.
112. Haberl,R.L. The cerebral microcirculation in stroke. *Thromb. Res.* 74 Suppl 1, S13-S19. 1994.
113. Hacke,W. *Neurologie.* Springer Verlag , 596. 2010a.
114. Hacke,W. *Neurologie.* Springer Verlag , 170-175. 2010b.
115. Hacke,W. *Neurologie.* Springer Verlag , 597-598. 2010c.
116. Hakim,A.M. The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol. Sci.* 14[4], 557-559. 1987.
117. Hakim,A.M. Ischemic penumbra: the therapeutic window. *Neurology* 51[3 Suppl 3], S44-S46. 1998.
118. Han,Z. and Patil,R.V. Protein kinase A-dependent phosphorylation of aquaporin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273[1], 328-332. 2000.
119. Han,Z., Wax,M.B., and Patil,R.V. Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273[11], 6001-6004. 1998.
120. Hannay,H.J., Feldman,Z., Phan,P., Keyani,A., Panwar,N., Goodman,J.C., and Robertson,C.S. Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *J. Neurotrauma* 16[11], 1103-1114. 1999.
121. Harper,A.M. Autoregulation of cerebral blood flow: influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry* 29[5], 398-403. 1966.
122. Hasegawa,H., Ma,T., Skach,W., Matthay,M.A., and Verkman,A.S. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem.* 269[8], 5497-5500. 1994.

123. Hayoz,D., Bizzini,G., Noel,B., Depairon,M., Burnier,M., Fauveau,C., Rouillon,A., Brouard,R., and Brunner,H.R. Effect of SR 49059, a V1a vasopressin receptor antagonist, in Raynaud's phenomenon. *Rheumatology. (Oxford)* 39[10], 1132-1138. 2000.
124. Heymann,J.B., Agre,P., and Engel,A. Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J. Struct. Biol.* 121[2], 191-206. 1998.
125. Higashida,T., Kreipke,C.W., Rafols,J.A., Peng,C., Schafer,S., Schafer,P., Ding,J.Y., Dornbos,D., III, Li,X., Guthikonda,M., Rossi,N.F., and Ding,Y. The role of hypoxia-inducible factor-1alpha, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 114[1], 92-101. 2011.
126. Hockel,K., Scholler,K., Trabold,R., Nussberger,J., and Plesnila,N. Vasopressin V(1a) receptors mediate posthemorrhagic systemic hypertension thereby determining rebleeding rate and outcome after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 43[1], 227-232. 2012.
127. Holmes,C.L., Landry,D.W., and Granton,J.T. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* 7[6], 427-434. 2003.
128. Huang,W.D., Yang,Y.M., and Wu,S.D. Changes of arginine vasopressin in elderly patients with acute traumatic cerebral injury. *Chin J. Traumatol.* 6[3], 139-141. 2003.
129. Hub,J.S., Grubmuller,H., and de Groot,B.L. Dynamics and energetics of permeation through aquaporins. What do we learn from molecular dynamics simulations? *Handb. Exp. Pharmacol.* [190], 57-76. 2009.
130. Huggett,J., Dheda,K., Bustin,S., and Zumla,A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6[4], 279-284. 2005.
131. Hunt,M. Real Time PCR. Microbiology and Immunology On-line, University of South Carolina, School of Medicine . 2010.
132. Ishibashi,K. Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins). *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 52[7], 20-27. 2006.
133. Ishibashi,K., Kuwahara,M., Gu,Y., Tanaka,Y., Marumo,F., and Sasaki,S. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244[1], 268-274. 1998.
134. Itoh,T., Rai,T., Kuwahara,M., Ko,S.B., Uchida,S., Sasaki,S., and Ishibashi,K. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330[3], 832-838. 2005.
135. Jaeger,M., Dengl,M., Meixensberger,J., and Schuhmann,M.U. Effects of cerebrovascular pressure reactivity-guided optimization of cerebral perfusion pressure on brain tissue oxygenation after traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 38[5], 1343-1347. 2010.
136. Jennett,B. and Bond,M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet* 1[7905], 480-484. 1975.
137. Jung,J.S., Bhat,R.V., Preston,G.M., Guggino,W.B., Baraban,J.M., and Agre,P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91[26], 13052-13056. 1994a.
138. Jung,J.S., Preston,G.M., Smith,B.L., Guggino,W.B., and Agre,P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269[20], 14648-14654. 1994b.
139. Juul,N., Morris,G.F., Marshall,S.B., and Marshall,L.F. Intracranial hypertension and cerebral perfusion pressure: influence on neurological deterioration and outcome in severe head injury. The Executive Committee of the International Selfotel Trial. *J. Neurosurg.* 92[1], 1-6. 2000.
140. Katayama,Y., Becker,D.P., Tamura,T., and Hovda,D.A. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J. Neurosurg.* 73[6], 889-900. 1990.
141. Ke,C., Poon,W.S., Ng,H.K., Pang,J.C., and Chan,Y. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci. Lett.* 301[1], 21-24. 2001.

142. Kellie,G. An account with some reflections on the pathology of the brain. *Edinburgh Med Chir Trans* , 84-169. 1824.
143. Khalili-Araghi,F., Gumbart,J., Wen,P.C., Sotomayor,M., Tajkhorshid,E., and Schulten,K. Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19[2], 128-137. 2009.
144. Kiening,K.L., van Landeghem,F.K., Schreiber,S., Thomale,U.W., von Deimling,A., Unterberg,A.W., and Stover,J.F. Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci. Lett.* 324[2], 105-108. 2002.
145. Kimelberg,H.K. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J. Neurosurg.* 83[6], 1051-1059. 1995.
146. Klatzo,I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26[1], 1-14. 1967.
147. Klatzo,I. Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* 60, 3-6. 1994.
148. Kleindienst,A., Fazzina,G., Dunbar,J.G., Glisson,R., and Marmarou,A. Protective effect of the V1a receptor antagonist SR49059 on brain edema formation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neurochir. Suppl* 96, 303-306. 2006.
149. Klingenhöfer J. and Berthele A. *Klinikleitfaden Neurologie*. Elsevier 4. Aufl., 1100-1101. 2009.
150. Knepper,M.A. and Inoue,T. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9[4], 560-564. 1997.
151. Kobayashi,H., Minami,S., Itoh,S., Shiraishi,S., Yokoo,H., Yanagita,T., Uezono,Y., Mohri,M., and Wada,A. Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neurosci. Lett.* 297[3], 163-166. 2001.
152. Kobayashi,H., Yokoo,H., Yanagita,T., Satoh,S., Kis,B., Deli,M., Niwa,M., and Wada,A. Induction of aquaporin 1 by dexamethasone in lipid rafts in immortalized brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1123[1], 12-19. 2006.
153. Koshimizu,T.A., Nasa,Y., Tanoue,A., Oikawa,R., Kawahara,Y., Kiyono,Y., Adachi,T., Tanaka,T., Kuwaki,T., Mori,T., Takeo,S., Okamura,H., and Tsujimoto,G. V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103[20], 7807-7812. 2006.
154. Lam,T.I., Wise,P.M., and O'Donnell,M.E. Cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange: evidence for the presence of NHE1 and NHE2 isoforms and regulation by arginine vasopressin. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 297[2], C278-C289. 2009.
155. Landis,D.M. and Reese,T.S. Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* 60[1], 316-320. 1974.
156. Lassen,N.A. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* 39[2], 183-238. 1959.
157. Latzkovits,L., Cserr,H.F., Park,J.T., Patlak,C.S., Pettigrew,K.D., and Rimanoczy,A. Effects of arginine vasopressin and atriopeptin on glial cell volume measured as 3-MG space. *Am. J. Physiol* 264[3 Pt 1], C603-C608. 1993.
158. Lemmens-Gruber,R. and Kamyar,M. [Pharmacology and clinical relevance of vasopressin antagonists]. *Internist (Berl)* 49[5], 628, 629-4. 2008.
159. Lighthall,J.W. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J. Neurotrauma* 5[1], 1-15. 1988.
160. Lighthall,J.W., Dixon,C.E., and Anderson,T.E. Experimental models of brain injury. *J. Neurotrauma* 6[2], 83-97. 1989.
161. Liu,X., Nakayama,S., Amiry-Moghaddam,M., Ottersen,O.P., and Bhardwaj,A. Arginine-vasopressin V1 but not V2 receptor antagonism modulates infarct volume, brain water content, and aquaporin-4 expression following experimental stroke. *Neurocrit. Care* 12[1], 124-131. 2010.

162. Löffler G., Petrides P.E., and Heinrich P.C. Biochemie & Pathobiochemie. Springer Verlag , 182-183. 2007.
163. Luttmann W., Bratke K., Küpper,M., and Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 3. Auflage, 159. 2009a.
164. Luttmann W., Bratke K., Küpper,M., and Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 3. Auflage, 172. 2009b.
165. Luttmann W., Bratke K., Küpper,M., and Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 3. Auflage, 15-20. 2009c.
166. Magni,F., Sarto,C., Ticozzi,D., Soldi,M., Bosso,N., Mocarelli,P., and Kienle,M.G. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*. 6[20], 5637-5649. 2006.
167. Manaenko,A., Fathali,N., Khatibi,N.H., Lekic,T., Hasegawa,Y., Martin,R., Tang,J., and Zhang,J.H. Arginine-vasopressin V(1a) receptor inhibition improves neurologic outcomes following an intracerebral hemorrhagic brain injury. *Neurochem. Int.* 58[4], 542-548. 2011.
168. Manley,G., Knudson,M.M., Morabito,D., Damron,S., Erickson,V., and Pitts,L. Hypotension, hypoxia, and head injury: frequency, duration, and consequences. *Arch. Surg.* 136[10], 1118-1123. 2001.
169. Manley,G.T., Binder,D.K., Papadopoulos,M.C., and Verkman,A.S. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129[4], 983-991. 2004.
170. Manley,G.T., Fujimura,M., Ma,T., Noshita,N., Filiz,F., Bollen,A.W., Chan,P., and Verkman,A.S. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* 6[2], 159-163. 2000.
171. Marmarou A. Impact of ICP instability and hypotension on outcome in patients with severe head trauma. *J Neurosurg* 75. 1991.
172. Marmarou,A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir. Suppl* 86, 7-10. 2003.
173. Marmarou,A., Fatouros,P.P., Barzo,P., Portella,G., Yoshihara,M., Tsuji,O., Yamamoto,T., Laine,F., Signoretti,S., Ward,J.D., Bullock,M.R., and Young,H.F. Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. *J. Neurosurg.* 93[2], 183-193. 2000.
174. Marmarou,A., Foda,M.A., van den,B.W., Campbell,J., Kita,H., and Demetriadou,K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 80[2], 291-300. 1994.
175. Marmarou,A., Signoretti,S., Fatouros,P.P., Portella,G., Aygok,G.A., and Bullock,M.R. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J. Neurosurg.* 104[5], 720-730. 2006.
176. Marmarou,A., Takagi,H., and Shulman,K. Biomechanics of brain edema and effects on local cerebral blood flow. *Adv. Neurol.* 28, 345-358. 1980.
177. Marshall,L.F., Smith,R.W., and Shapiro,H.M. The outcome with aggressive treatment in severe head injuries. Part I: the significance of intracranial pressure monitoring. *J. Neurosurg.* 50[1], 20-25. 1979.
178. Masaki,H., Wakayama,Y., Hara,H., Jimi,T., Unaki,A., Iijima,S., Oniki,H., Nakano,K., Kishimoto,K., and Hirayama,Y. Immunocytochemical Studies of Aquaporin 4, Kir4.1, and alpha1-syntrophin in the Astrocyte Endfeet of Mouse Brain Capillaries. *Acta Histochem. Cytochem.* 43[4], 99-105. 2010.
179. Massequin,C., Corcoran,M., Carcenac,C., Daunton,N.G., Guell,A., Verkman,A.S., and Gabrion,J. Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J. Appl. Physiol* 88[3], 843-850. 2000.
180. Matsuzaki,T., Tajika,Y., Ablimit,A., Aoki,T., Hagiwara,H., and Takata,K. Aquaporins in the digestive system. *Med. Electron Microsc.* 37[2], 71-80. 2004.
181. Maybauer,M.O., Maybauer,D.M., Enkhbaatar,P., and Traber,D.L. Physiology of the vasopressin receptors. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 22[2], 253-263. 2008.

182. Mazaux,J.M., Croze,P., Quintard,B., Rouxel,L., Joseph,P.A., Richer,E., Debelleix,X., and Barat,M. Satisfaction of life and late psycho-social outcome after severe brain injury: a nine-year follow-up study in Aquitaine. *Acta Neurochir. Suppl* 79, 49-51. 2002.
183. McCoy,E. and Sontheimer,H. MAPK induces AQP1 expression in astrocytes following injury. *Glia* 58[2], 209-217. 2010.
184. McCoy,E.S., Haas,B.R., and Sontheimer,H. Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion. *Neuroscience* 168[4], 971-981. 2010.
185. McHugh,G.S., Engel,D.C., Butcher,I., Steyerberg,E.W., Lu,J., Mushkudiani,N., Hernandez,A.V., Marmarou,A., Maas,A.I., and Murray,G.D. Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J. Neurotrauma* 24[2], 287-293. 2007.
186. Mendelow,A.D. and Teasdale,G.M. Pathophysiology of head injuries. *Br. J. Surg.* 70[11], 641-650. 1983.
187. Migliati,E., Meurice,N., DuBois,P., Fang,J.S., Somasekharan,S., Beckett,E., Flynn,G., and Yool,A.J. Inhibition of aquaporin-1 and aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site. *Mol. Pharmacol.* 76[1], 105-112. 2009.
188. Migliati,E.R., Amiry-Moghaddam,M., Froehner,S.C., Adams,M.E., Ottersen,O.P., and Bhardwaj,A. Na(+)-K (+)-2Cl (-) cotransport inhibitor attenuates cerebral edema following experimental stroke via the perivascular pool of aquaporin-4. *Neurocrit. Care* 13[1], 123-131. 2010.
189. Mobasheri,A., Wray,S., and Marples,D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J. Mol. Histol.* 36[1-2], 1-14. 2005.
190. Moe,S.E., Sorbo,J.G., Sogaard,R., Zeuthen,T., Petter,O.O., and Holen,T. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics* 91[4], 367-377. 2008.
191. Moeller,H.B., Fenton,R.A., Zeuthen,T., and Macaulay,N. Vasopressin-dependent short-term regulation of aquaporin 4 expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience* 164[4], 1674-1684. 2009.
192. Mokri,B. The Monroe-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology* 56[12], 1746-1748. 2001.
193. Monje,P., Hernandez-Losa,J., Lyons,R.J., Castellone,M.D., and Gutkind,J.S. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J. Biol. Chem.* 280[42], 35081-35084. 2005.
194. Monroe,A. Observations on structure and functions of the nervous system. Edinburgh: Creech and Johnson . 1783.
195. Morishita,Y., Sakube,Y., Sasaki,S., and Ishibashi,K. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96[3], 276-279. 2004.
196. Muizelaar,J.P., Ward,J.D., Marmarou,A., Newlon,P.G., and Wachi,A. Cerebral blood flow and metabolism in severely head-injured children. Part 2: Autoregulation. *J. Neurosurg.* 71[1], 72-76. 1989.
197. Mullen,R.J., Buck,C.R., and Smith,A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116[1], 201-211. 1992.
198. Murata,K., Mitsuoka,K., Hirai,T., Walz,T., Agre,P., Heymann,J.B., Engel,A., and Fujiyoshi,Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407[6804], 599-605. 2000.
199. Murphy,T., Dhar,R., and Diringier,M. Conivaptan bolus dosing for the correction of hyponatremia in the neurointensive care unit. *Neurocrit. Care* 11[1], 14-19. 2009.
200. Mylonakou,M.N., Petersen,P.H., Rinvik,E., Rojek,A., Valdimarsdottir,E., Zelenin,S., Zeuthen,T., Nielsen,S., Ottersen,O.P., and miry-Moghaddam,M. Analysis of mice with targeted deletion of AQP9 gene provides conclusive evidence for expression of AQP9 in neurons. *J. Neurosci. Res.* 87[6], 1310-1322. 2009.
201. Nagelhus,E.A., Horio,Y., Inanobe,A., Fujita,A., Haug,F.M., Nielsen,S., Kurachi,Y., and Ottersen,O.P. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller

- cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26[1], 47-54. 1999.
202. Nagelhus,E.A., Mathiisen,T.M., and Ottersen,O.P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129[4], 905-913. 2004.
 203. Neal,C.J., Lee,E.Y., Gyorgy,A., Ecklund,J.M., Agoston,D.V., and Ling,G.S. Effect of penetrating brain injury on aquaporin-4 expression using a rat model. *J. Neurotrauma* 24[10], 1609-1617. 2007.
 204. Neely,J.D., Christensen,B.M., Nielsen,S., and Agre,P. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry* 38[34], 11156-11163. 1999.
 205. Neves,S.R., Ram,P.T., and Iyengar,R. G protein pathways. *Science* 296[5573], 1636-1639. 2002.
 206. Nicchia,G.P., Frigeri,A., Nico,B., Ribatti,D., and Svelto,M. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J. Histochem. Cytochem.* 49[12], 1547-1556. 2001.
 207. Nielsen,S., Nagelhus,E.A., miry-Moghaddam,M., Bourque,C., Agre,P., and Ottersen,O.P. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17[1], 171-180. 1997.
 208. Nielsen,S., Smith,B.L., Christensen,E.I., and Agre,P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90[15], 7275-7279. 1993a.
 209. Nielsen,S., Smith,B.L., Christensen,E.I., Knepper,M.A., and Agre,P. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* 120[2], 371-383. 1993b.
 210. O'Donnell,M.E., Duong,V., Suvatne,J., Foroutan,S., and Johnson,D.M. Arginine vasopressin stimulation of cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransporter activity is V1 receptor and [Ca] dependent. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 289[2], C283-C292. 2005.
 211. O'Donnell,M.L., Varker,T., Holmes,A.C., Ellen,S., Wade,D., Creamer,M., Silove,D., McFarlane,A., Bryant,R.A., and Forbes,D. Disability after injury: the cumulative burden of physical and mental health. *J. Clin. Psychiatry* 74[2], e137-e143. 2013.
 212. Ogunshola,O.O. and Al-Ahmad,A. HIF-1 at the Blood-Brain Barrier: A Mediator of Permeability? *High Alt. Med. Biol.* 13[3], 153-161. 2012.
 213. Okuno,K., Taya,K., Marmarou,C.R., Ozisik,P., Fazzina,G., Kleindienst,A., Gulsen,S., and Marmarou,A. The modulation of aquaporin-4 by using PKC-activator (phorbol myristate acetate) and V1a receptor antagonist (SR49059) following middle cerebral artery occlusion/reperfusion in the rat. *Acta Neurochir. Suppl* 102, 431-436. 2008.
 214. Oliva,A.A., Jr., Kang,Y., Truettner,J.S., Sanchez-Molano,J., Furones,C., Yool,A.J., and Atkins,C.M. Fluid-percussion brain injury induces changes in aquaporin channel expression. *Neuroscience* . 2011.
 215. Oliver,G. and Schafer,E.A. On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body and certain other Glandular Organs: Preliminary Communication. *J. Physiol* 18[3], 277-279. 1895.
 216. Oshio,K., Song,Y., Verkman,A.S., and Manley,G.T. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir. Suppl* 86, 525-528. 2003.
 217. Oshio,K., Watanabe,H., Song,Y., Verkman,A.S., and Manley,G.T. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J.* 19[1], 76-78. 2005.
 218. Ostrowski,N.L., Lolait,S.J., and Young,W.S., III Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* 135[4], 1511-1528. 1994.
 219. Papadopoulos,M.C., Manley,G.T., Krishna,S., and Verkman,A.S. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J.* 18[11], 1291-1293. 2004.
 220. Papadopoulos,M.C. and Verkman,A.S. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr. Nephrol.* 22[6], 778-784. 2007.

221. Papadopoulos,M.C. and Verkman,A.S. Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders. *Prog. Brain Res.* 170, 589-601. 2008.
222. Pasantes-Morales,H. and Cruz-Rangel,S. Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience* 168[4], 871-884. 2010.
223. Pascale,C.L., Szmydynger-Chodobska,J., Sarri,J.E., and Chodobski,A. Traumatic brain injury results in a concomitant increase in neocortical expression of vasopressin and its V1a receptor. *J. Physiol Pharmacol.* 57 Suppl 11, 161-167. 2006.
224. Patil,R.V., Han,Z., and Wax,M.B. Regulation of water channel activity of aquaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238[2], 392-396. 1997.
225. Paulson,O.B., Strandgaard,S., and Edvinsson,L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* 2[2], 161-192. 1990.
226. Paxinos,G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press . 2001.
227. Pfaffl,M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29[9], e45. 2001.
228. Plesnila,N. Decompression craniectomy after traumatic brain injury: recent experimental results. *Prog. Brain Res.* 161, 393-400. 2007.
229. Plesnila,N., Zinkel,S., Le,D.A., min-Hanjani,S., Wu,Y., Qiu,J., Chiarugi,A., Thomas,S.S., Kohane,D.S., Korsmeyer,S.J., and Moskowitz,M.A. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98[26], 15318-15323. 2001.
230. Polavarapu,R., Gongora,M.C., Winkles,J.A., and Yepes,M. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases the permeability of the neurovascular unit through nuclear factor-kappa B pathway activation. *J. Neurosci* 25[44], 10094-10100. 2005.
231. Praetorius,J. and Nielsen,S. Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 291[1], C59-C67. 2006.
232. Preston,G.M. and Agre,P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88[24], 11110-11114. 1991.
233. Preston,G.M., Carroll,T.P., Guggino,W.B., and Agre,P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256[5055], 385-387. 1992.
234. Preston,G.M., Jung,J.S., Guggino,W.B., and Agre,P. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol. Chem.* 269[3], 1668-1673. 1994.
235. Raggenbass,M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* 583[2-3], 243-254. 2008.
236. Raichle,M.E. and Grubb,R.L., Jr. Regulation of brain water permeability by centrally-released vasopressin. *Brain Res.* 143[1], 191-194. 1978.
237. Ransom,B.R., Yamate,C.L., and Connors,B.W. Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study. *J. Neurosci.* 5[2], 532-535. 1985.
238. Rap,Z.M. and Chwalbinska-Moneta,J. Vasopressin concentration in the blood during acute short-term intracranial hypertension in cats. *Adv. Neurol.* 20, 381-388. 1978.
239. Rash,J.E., Yasumura,T., Hudson,C.S., Agre,P., and Nielsen,S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95[20], 11981-11986. 1998.
240. Raslan,F., bert-Weissenberger,C., Ernestus,R.I., Kleinschnitz,C., and Siren,A.L. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp. Transl. Stroke Med.* 4, 6. 2012.
241. Rauen,K., Trabold,R., Brem,C., Terpolilli,N.A., and Plesnila,N. Arginine vasopressin V1a receptor deficient mice have reduced brain edema and secondary brain damage following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* . 2013.

242. Rhinn,H., Marchand-Leroux,C., Croci,N., Plotkine,M., Scherman,D., and Escriou,V. Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC. Mol. Biol.* 9, 62. 2008.
243. Rickels E. Schädel-Hirn-Verletzungen. Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. Zuckschwerdt Verlag . 2006.
244. Rickels,E. [Diagnosis and treatment of traumatic brain injury]. *Chirurg* 80[2], 153-162. 2009.
245. Robertson,C.S., Valadka,A.B., Hannay,H.J., Contant,C.F., Gopinath,S.P., Cormio,M., Uzura,M., and Grossman,R.G. Prevention of secondary ischemic insults after severe head injury. *Crit Care Med.* 27[10], 2086-2095. 1999.
246. Rojek,A., Praetorius,J., Frokiaer,J., Nielsen,S., and Fenton,R.A. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol* 70, 301-327. 2008.
247. Ropper Allan H.,S.M.A. Adams und Victor's Principles of Neurology. Mc Graw Hill , 618-619. 2009.
248. Rosenberg,G.A., Estrada,E., and Kyner,W.T. Vasopressin-induced brain edema is mediated by the V1 receptor. *Adv. Neurol.* 52, 149-154. 1990.
249. Rosenberg,G.A., Scremin,O., Estrada,E., and Kyner,W.T. Arginine vasopressin V1-antagonist and atrial natriuretic peptide reduce hemorrhagic brain edema in rats. *Stroke* 23[12], 1767-1773. 1992.
250. Rosner,M.J. and Daughton,S. Cerebral perfusion pressure management in head injury. *J. Trauma* 30[8], 933-940. 1990.
251. Rossi,A., Crane,J.M., and Verkman,A.S. Aquaporin-4 Mz isoform: brain expression, supramolecular assembly and neuromyelitis optica antibody binding. *Glia* 59[7], 1056-1063. 2011.
252. Rozen,S. and Skaletsky,H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Humana Press, Totowa, NJ , 365-386. 2000.
253. Russell,J.T., Brownstein,M.J., and Gainer,H. Biosynthesis of vasopressin, oxytocin, and neurophysins: isolation and characterization of two common precursors (propressophysin and prooxyphysin). *Endocrinology* 107[6], 1880-1891. 1980.
254. Rutland-Brown,W., Langlois,J.A., Thomas,K.E., and Xi,Y.L. Incidence of traumatic brain injury in the United States, 2003. *J. Head Trauma Rehabil.* 21[6], 544-548. 2006.
255. Rychlik,W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* 3[2], 129-134. 1995.
256. Saparov,S.M., Kozono,D., Rothe,U., Agre,P., and Pohl,P. Water and ion permeation of aquaporin-1 in planar lipid bilayers. Major differences in structural determinants and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 276[34], 31515-31520. 2001.
257. Sawyer,W.H. and Manning,M. Synthetic analogs of oxytocin and the vasopressins. *Annu. Rev. Pharmacol.* 13, 1-17. 1973.
258. Sawyer,W.H. and Manning,M. The development of vasopressin antagonists. *Fed. Proc.* 43[1], 87-90. 1984.
259. Schreiber,M.A., Aoki,N., Scott,B.G., and Beck,J.R. Determinants of mortality in patients with severe blunt head injury. *Arch. Surg.* 137[3], 285-290. 2002.
260. Schrier,R.W., Berl,T., and Anderson,R.J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am. J. Physiol* 236[4], F321-F332. 1979.
261. Sharples,P.M., Storey,A., ynsley-Green,A., and Eyre,J.A. Avoidable factors contributing to death of children with head injury. *BMJ* 300[6717], 87-91. 1990.
262. Siegenthaler,W., Blum,H.E., and Oertel,W.H. Klinische Pathophysiologie., 1082-1084. 2006.
263. Siesjo,B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* 77[2], 169-184. 1992.

264. Siesjo,B.K. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann. Emerg. Med.* 22[6], 959-969. 1993.
265. Silberstein,C., Bouley,R., Huang,Y., Fang,P., Pastor-Soler,N., Brown,D., and van Hoek,A.N. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287[3], F501-F511. 2004.
266. Skandsen,T., Kvistad,K.A., Solheim,O., Strand,I.H., Folvik,M., and Vik,A. Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *J. Neurosurg.* 113[3], 556-563. 2010.
267. Sklar,A.H. and Schrier,R.W. Central nervous system mediators of vasopressin release. *Physiol Rev.* 63[4], 1243-1280. 1983.
268. Smith,D.H., Soares,H.D., Pierce,J.S., Perlman,K.G., Saatman,K.E., Meaney,D.F., Dixon,C.E., and McIntosh,T.K. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma* 12[2], 169-178. 1995.
269. Soe,R., Macaulay,N., and Klaerke,D.A. Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by small changes in cell volume. *Neurosci. Lett.* 457[2], 80-84. 2009.
270. Sofroniew,M.V. Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. *Prog. Brain Res.* 60, 101-114. 1983.
271. Sorbo,J.G., Fleckenstein,B., Ottersen,O.P., and Holen,T. Small-scale purification and mass spectrometry analysis reveal a third aquaporin-4 protein isoform of 36kDa in rat brain. *J. Neurosci. Methods* 211[1], 31-39. 2012.
272. Sorensen,P.S., Gjerris,A., and Hammer,M. Cerebrospinal fluid vasopressin in neurological and psychiatric disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 48[1], 50-57. 1985.
273. Staub,F., Winkler,A., Haberstrok,J., Plesnila,N., Peters,J., Chang,R.C., Kempinski,O., and Baethmann,A. Swelling, intracellular acidosis, and damage of glial cells. *Acta Neurochir. Suppl* 66, 56-62. 1996.
274. Steiner,E., Enzmann,G.U., Lin,S., Ghavampour,S., Hannocks,M.J., Zuber,B., Ruegg,M.A., Sorokin,L., and Engelhardt,B. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia* 60[11], 1646-1659. 2012.
275. Strange,K. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3[1], 12-27. 1992.
276. Strich,S.J. Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 19[3], 163-185. 1956.
277. Stroop,R., Thomale,U.W., Pauser,S., Bernarding,J., Vollmann,W., Wolf,K.J., Lanksch,W.R., and Unterberg,A.W. Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterization of brain edema after controlled cortical impact injury (CCII). *Acta Neurochir. Suppl* 71, 303-305. 1998.
278. Sun,M.C., Honey,C.R., Berk,C., Wong,N.L., and Tsui,J.K. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. *J. Neurosurg.* 98[3], 565-569. 2003.
279. Suzuki,R., Okuda,M., Asai,J., Nagashima,G., Itokawa,H., Matsunaga,A., Fujimoto,T., and Suzuki,T. Astrocytes co-express aquaporin-1, -4, and vascular endothelial growth factor in brain edema tissue associated with brain contusion. *Acta Neurochir. Suppl* 96, 398-401. 2006.
280. Szmydynger-Chodobska,J., Chung,I., Kozniowska,E., Tran,B., Harrington,F.J., Duncan,J.A., and Chodobski,A. Increased expression of vasopressin v1a receptors after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 21[8], 1090-1102. 2004.
281. Szmydynger-Chodobska,J., Fox,L.M., Lynch,K.M., Zink,B.J., and Chodobski,A. Vasopressin amplifies the production of proinflammatory mediators in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 27[8], 1449-1461. 2010.
282. Szmydynger-Chodobska,J., Zink,B.J., and Chodobski,A. Multiple sites of vasopressin synthesis in the injured brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 31[1], 47-51. 2011.
283. Szot,P., Bale,T.L., and Dorsa,D.M. Distribution of messenger RNA for the vasopressin V1a receptor in the CNS of male and female rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24[1-4], 1-10. 1994.

284. Tagliaferri,F., Compagnone,C., Korsic,M., Servadei,F., and Kraus,J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien.)* 148[3], 255-268. 2006.
285. Tait,M.J., Saadoun,S., Bell,B.A., and Papadopoulos,M.C. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci.* 31[1], 37-43. 2008.
286. Tait,M.J., Saadoun,S., Bell,B.A., Verkman,A.S., and Papadopoulos,M.C. Increased brain edema in aqp4-null mice in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* 167[1], 60-67. 2010.
287. Takahashi,H., Manaka,S., and Sano,K. Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of experimental closed head injury. *J. Neurosurg.* 55[5], 708-717. 1981.
288. Taniguchi,M., Yamashita,T., Kumura,E., Tamatani,M., Kobayashi,A., Yokawa,T., Maruno,M., Kato,A., Ohnishi,T., Kohmura,E., Tohyama,M., and Yoshimine,T. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78[1-2], 131-137. 2000.
289. Taya,K., Gulsen,S., Okuno,K., Prieto,R., Marmarou,C.R., and Marmarou,A. Modulation of AQP4 expression by the selective V1a receptor antagonist, SR49059, decreases trauma-induced brain edema. *Acta Neurochir. Suppl* 102, 425-429. 2008.
290. Taya,K., Marmarou,C.R., Okuno,K., Prieto,R., and Marmarou,A. Effect of secondary insults upon aquaporin-4 water channels following experimental cortical contusion in rats. *J. Neurotrauma* 27[1], 229-239. 2010.
291. Teasdale,G. and Jennett,B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2[7872], 81-84. 1974.
292. Terpolilli,N.A. Einfluss der Stickstoff-Monoxid-Inhalation auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädelhirntrauma. Verlag Dr. Hut , S. 44. 2008.
293. Terpolilli,N.A., Zweckberger,K., Trabold,R., Schilling,L., Schinzel,R., Tegtmeier,F., and Plesnila,N. The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 26[11], 1963-1975. 2009.
294. Thal,S.C., Wyschkon,S., Pieter,D., Engelhard,K., and Werner,C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J. Neurotrauma* 25[7], 785-794. 2008.
295. Thellin,O., Zorzi,W., Lakaye,B., De,B.B., Coumans,B., Hennen,G., Grisar,T., Igout,A., and Heinen,E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75[2-3], 291-295. 1999.
296. Thibonnier,M., Berti-Mattera,L.N., Dulin,N., Conarty,D.M., and Mattera,R. Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog. Brain Res.* 119, 147-161. 1998.
297. Thibonnier,M., Preston,J.A., Dulin,N., Wilkins,P.L., Berti-Mattera,L.N., and Mattera,R. The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology* 138[10], 4109-4122. 1997.
298. Timmons,S.D. Current trends in neurotrauma care. *Crit Care Med.* 38[9 Suppl], S431-S444. 2010.
299. Tomura,S., Nawashiro,H., Otani,N., Uozumi,Y., Toyooka,T., Ohsumi,A., and Shima,K. Effect of decompressive craniectomy on aquaporin-4 expression after lateral fluid percussion injury in rats. *J. Neurotrauma* 28[2], 237-243. 2011.
300. Trabold,R., Krieg,S., Scholler,K., and Plesnila,N. Role of vasopressin V(1a) and V2 receptors for the development of secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 25[12], 1459-1465. 2008.
301. Tribollet,E., Arsenijevic,Y., and Barberis,C. Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog. Brain Res.* 119, 45-55. 1998.

302. Tsukaguchi,H., Weremowicz,S., Morton,C.C., and Hediger,M.A. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol* 277[5 Pt 2], F685-F696. 1999.
303. Tsunoda,S.P., Wiesner,B., Lorenz,D., Rosenthal,W., and Pohl,P. Aquaporin-1, nothing but a water channel. *J. Biol. Chem.* 279[12], 11364-11367. 2004.
304. Unterberg,A.W., Stover,J., Kress,B., and Kiening,K.L. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129[4], 1021-1029. 2004.
305. Unterberg,A.W., Stroop,R., Thomale,U.W., Kiening,K.L., Pauser,S., and Vollmann,W. Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir. Suppl* 70, 106-108. 1997.
306. Vakili,A., Kataoka,H., and Plesnila,N. Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25[8], 1012-1019. 2005.
307. Verbavatz,J.M., Ma,T., Gobin,R., and Verkman,A.S. Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 22), 2855-2860. 1997.
308. Verkman,A.S. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9[5], 517-522. 2000.
309. Verkman,A.S. Aquaporins at a glance. *J. Cell Sci.* 124[Pt 13], 2107-2112. 2011.
310. Verkman,A.S., Binder,D.K., Bloch,O., Auguste,K., and Papadopoulos,M.C. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1758[8], 1085-1093. 2006.
311. Verkman,A.S. and Mitra,A.K. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278[1], F13-F28. 2000.
312. Verney,E.B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 135[878], 25-106. 1947.
313. Waetzig,V. and Herdegen,T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol. Sci.* 26[9], 455-461. 2005.
314. Walcott,B.P., Kahle,K.T., and Simard,J.M. Novel treatment targets for cerebral edema. *Neurotherapeutics.* 9[1], 65-72. 2012.
315. Walz,T., Fujiyoshi,Y., and Engel,A. The AQP structure and functional implications. *Handb. Exp. Pharmacol.* [190], 31-56. 2009.
316. Weitzman,R.E. and Kleeman,C.R. The clinical physiology of water metabolism. Part I: The physiologic regulation of arginine vasopressin secretion and thirst. *West J. Med.* 131[5], 373-400. 1979.
317. Wright,W.L., Asbury,W.H., Gilmore,J.L., and Samuels,O.B. Conivaptan for hyponatremia in the neurocritical care unit. *Neurocrit. Care* 11[1], 6-13. 2009.
318. Xu,M., Su,W., Huang,W.D., Lu,Y.Q., Xu,Q.P., and Chen,Z.J. Effect of AVP on brain edema following traumatic brain injury. *Chin J. Traumatol.* 10[2], 90-93. 2007.
319. Yamamoto,N., Sobue,K., Fujita,M., Katsuya,H., and Asai,K. Differential regulation of aquaporin-5 and -9 expression in astrocytes by protein kinase A. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104[1], 96-102. 2002.
320. Yamamoto,N., Sobue,K., Miyachi,T., Inagaki,M., Miura,Y., Katsuya,H., and Asai,K. Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 95[1-2], 110-116. 2001a.
321. Yamamoto,N., Yoneda,K., Asai,K., Sobue,K., Tada,T., Fujita,Y., Katsuya,H., Fujita,M., Aihara,N., Mase,M., Yamada,K., Miura,Y., and Kato,T. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90[1], 26-38. 2001b.
322. Yang,B., Brown,D., and Verkman,A.S. The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 271[9], 4577-4580. 1996.

323. Yang,B. and Verkman,A.S. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 272[26], 16140-16146. 1997.
324. Yang,B., Zador,Z., and Verkman,A.S. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J. Biol. Chem.* 283[22], 15280-15286. 2008.
325. Yang,M., Gao,F., Liu,H., Yu,W.H., and Sun,S.Q. Temporal changes in expression of aquaporin-3, -4, -5 and -8 in rat brains after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1290, 121-132. 2009.
326. Yang,M., Gao,F., Liu,H., Yu,W.H., Zhuo,F., Qiu,G.P., Ran,J.H., and Sun,S.Q. Hyperosmotic induction of aquaporin expression in rat astrocytes through a different MAPK pathway. *J. Cell Biochem.* 2012.
327. Yatsushige,H., Ostrowski,R.P., Tsubokawa,T., Colohan,A., and Zhang,J.H. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosci. Res.* 85[7], 1436-1448. 2007.
328. Yool,A.J. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist.* 13[5], 470-485. 2007.
329. Yool,A.J., Brown,E.A., and Flynn,G.A. Roles for novel pharmacological blockers of aquaporins in the treatment of brain oedema and cancer. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 37[4], 403-409. 2010.
330. Yool,A.J. and Campbell,E.M. Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels. *Mol. Aspects Med.* 33[5-6], 553-561. 2012.
331. Yool,A.J., Stamer,W.D., and Regan,J.W. Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science* 273[5279], 1216-1218. 1996.
332. Yool,A.J. and Weinstein,A.M. New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1. *News Physiol Sci.* 17, 68-72. 2002.
333. Yoshida,M., Iwasaki,Y., Asai,M., Takayasu,S., Taguchi,T., Itoi,K., Hashimoto,K., and Oiso,Y. Identification of a functional AP1 element in the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology* 147[6], 2850-2863. 2006.
334. Yukutake,Y. and Yasui,M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience* 168[4], 885-891. 2010.
335. Zador,Z., Bloch,O., Yao,X., and Manley,G.T. Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog. Brain Res.* 161, 185-194. 2007.
336. Zador,Z., Stiver,S., Wang,V., and Manley,G.T. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb. Exp. Pharmacol.* [190], 159-170. 2009.
337. Zelenina,M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem. Int.* 57[4], 468-488. 2010.
338. Zelenina,M., Zelenin,S., Bondar,A.A., Brismar,H., and Aperia,A. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 283[2], F309-F318. 2002.
339. Zhang,W., Zitron,E., Homme,M., Kihm,L., Morath,C., Scherer,D., Hegge,S., Thomas,D., Schmitt,C.P., Zeier,M., Katus,H., Karle,C., and Schwenger,V. Aquaporin-1 channel function is positively regulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 282[29], 20933-20940. 2007.
340. Zhao,J., Moore,A.N., Clifton,G.L., and Dash,P.K. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury. *J. Neurosci Res.* 82[4], 499-506. 2005.
341. Zweckberger,K. Einfluss der Entlastungskraniektomie und des Kallikrein-Kinin Systems auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirntrauma., S. 19-21. 2006.
342. Zweckberger,K., Eros,C., Zimmermann,R., Kim,S.W., Engel,D., and Plesnila,N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 23[7], 1083-1093. 2006.
343. Zweckberger,K., Stoffel,M., Baethmann,A., and Plesnila,N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 20[12], 1307-1314. 2003.

7 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adenokortikotropes Hormon
ADC	<i>Apparent Diffusion Coefficient</i> : Diffusionsquotient als Maß für die Wasserpermeabilität
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANOVA on ranks	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
ANP	Antinatriuretisches Peptid
AP1	Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 1
AqB013	Arylsulfonamid, AQP1 und AQP4 Inhibitor
AQP	Aquaporin
AT	Adenin (Purin-Base) und Thymin (Pyrimidin-Base)
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> : elektronisches Programm, um experimentell ermittelte biologische DNA und Protein Sequenzen mit bereits vorhandenen Sequenzen zu vergleichen (Altschul et al., 1990).
bp	Basenpaar
CaMKII	Calcium/Calmodulin- abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CBF	<i>Cerebral Blood Flow</i> , zerebrale Durchblutung
CCI	Controlled Cortical Impact
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-fos	Proto-Onkogen der <i>Immediate Early Gene</i> Familie: Transkriptionsfaktor, der von dem sogenannten FOS Gen kodiert wird. Die <i>Immediate Early Gene</i> Familie zeichnet sich durch schnelle und breite Reaktion auf verschiedene Zellstimuli aus (Bossis et al., 2005; Monje et al., 2005).
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPP	<i>Cerebral Perfusion Pressure</i> , zerebraler Perfusionsdruck
CRE	<i>cAMP Resonsive Element</i> : moduliert Effekte der Proteinkinase A
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein</i> : Transkriptionsfaktor, der an CRE der DNA bindet und weitere Gene reguliert
Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i> : Schwellenwert, der den Beginn des exponentiellen Anstieges einer Kurve beschreibt
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol: Fluoreszenzfärbung, die dem Nachweis von DNA dient.
DGNC	Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dw	<i>dry weight</i> , Trockengewicht
e	<i>error</i> , Quadrat der Fehler vom Mittelwert der Einzelwerte
ePCR	elektronische PCR
EZR	Extrazellulärraum
FPI	<i>Fluid Percussion Injury</i> : experimentelles SHT Modell
GC	Guanin (Purin-Base) Cytosin (Pyrimidin-Base)
GCS	Glasgow Coma Scale

gDNA	genomische DNA
GFAP	<i>Glial fibrillary Acidic Protein</i> : zytoplasmatisches Intermediärfilament von Gliazellen. GFAP Färbung dient dem Nachweis von Gliazellen.
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor</i> , Gewebehypoxie-abhängiger Transkriptionsfaktor
HKG	Housekeeping-Gen
ICP	<i>Intracranial Pressure</i> , intrakranieller Druck
IP3	Inositol-1,4,5-Tri-Phosphat
IR	Immunreaktivität
IZR	Intrazellulärraum
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase: dient durch Phosphorylierung von N-terminalen Aminosäuren der intrazellulären Signaltransduktion
kDa	Kilodalton
Kir 4.1	<i>inward rectifier</i> Kaliumionenkanal
k.U.	kein Unterschied
LC-PCR	LightCycler® PCR: Verfahren zur quantitativen DNA Analyse
MAP	<i>Mean arterial pressure</i> , mittlerer arterieller Druck
MCAo	<i>Middle Cerebral Artery occlusion</i> : experimentelle Technik zur Auslösung einer Hirnischämie im Mediastromgebiet
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i> : neuronenspezifisches Zellkernprotein (neuronaler Marker) (Mullen et al., 1992).
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i> : weit verbreiteter Transkriptionsfaktor
NO	<i>Nitric Oxid</i> , Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
N-P-A	Asparagin – Prolin – Alanin
NSS	<i>Neurological Severity Score</i> : Score zur Beurteilung der neurologischen Funktion
OAP	<i>Orthogonal Arrays of Particles</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , Phosphat-Salz-Puffer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β
R	<i>Resistance</i> , hier: Gefäßwiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Enzym zum Abbau von Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT-PCR	<i>Real-Time-Polymerase Chain Reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR

SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
SHT	Schädel-Hirntrauma
siRNA	<i>small interfering RNA</i> : kurze RNA Moleküle, die u.a. die Genexpression der Zelle regulieren können.
SNK	Student Newman-Keuls Test, Signifikanztest
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
Taq-Polymerase	thermostabile DNA Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
T _m	<i>Melting Temperature</i> , Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V ₁ -Rezeptor	Vasopressin ₁ -Rezeptor
V ₂ -Rezeptor	Vasopressin ₂ -Rezeptor
ww	<i>wet weight</i> , Feuchtgewicht
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Anhang

8.1 Nissl-Färbung

70% Ethanol	2 min
Kresylechtviolett	10 min
Aqua dest.	3 x spülen
Aufsteigende Alkoholreihe je 2 x eintauchen	70%, 96%, 100%
Isopropanol	2 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Eindeckeln mit Eukitt® (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland)	

8.2 *Neurological Severity Score (NSS)*

Erreichbare Punktzahl	0 - 19
Beste neurologische Funktion	0 Punkte
Schlechteste neurologische Funktion	19 Punkte

Tests

Verlassen eines Reifens (d=0,5 cm)		
	verlässt Reifen innerhalb von 2 Minuten	0 Punkte
	bleibt auf Begrenzung sitzen	0,5 Punkte
	stellt sich an Begrenzung auf	1 Punkt
	bleibt innerhalb des Reifens	2 Punkte
Suchen		
	aktive Suche	0 Punkte
	sucht verlangsamt, macht Pausen	1 Punkt
	bleibt sitzen	2 Punkte
Bewegungsinitiation		
	spontane Bewegung	0 Punkte
	Bewegung nach Klatschen	1 Punkt
	keine Bewegung nach Klatschen	2 Punkte
Laufen		
	läuft gerade aus	0 Punkte
	zirkelt	1 Punkt
	keine Bewegung	2 Punkte
Hemiparese		
	unauffällige Fortbewegung	0 Punkte
	leichtes Hinken der linken Hinterpfote	1 Punkt
Balancieren auf einem Balken: Balkenbreite 2,5 cm/1,9 cm/0,9 cm; Balkenlänge 1 m		
	fehlerfreier Lauf über den Balken	je 0 Punkte
	regelmäßiges Abrutschen vom Balken, Kauern	je 1 Punkt
	fällt vom Balken herunter	je 2 Punkte

Balancieren und Greiffunktion: Stab eckig 0,5 x 0,5 cm; Stab rund Durchmesser 0,5 cm

hält sich trotz Schütteln mit allen 4 Pfoten am Stab	je 0 Punkte
hält sich trotz Schütteln mit 3 Pfoten am Stab	je 0,5 Punkte
fällt durch Schütteln herunter	je 1 Punkt
kann sich gar nicht halten	je 2 Punkte

8.3 Real-Time-PCR Protokoll

1. Roche-Mix herstellen

2. Primer-Mix ansetzen:

90 µl H₂O (destilliert und sterilisiert)

5 µl Primer forward

5 µl Primer reverse

3. Proben ansetzen:

1 µl cDNA der Versuchsprobe

1 µl Primer-Mix

2 µl Roche-Mix

6 µl Roche-H₂O

4. In jedem PCR-Lauf eine Probe H₂O als Negativkontrolle mitlaufen lassen

5. In jedem PCR-Lauf eine externe Standardkonzentration mitlaufen lassen

6. Programmeinstellung (Tabelle 6)

8.4 Paraffineinbettung

Ethanol	70%	1 Std.
	80%	1,5 Std.
	90%	1,5 Std.
	96%	1,5 Std.
	96%	1 Std.
	100%	1,5 Std.
	100%	1 Std.
Aceton		3 Std.
		3 Std.
Xylol		0,5 Std.
Paraplast		3 Std.
		4 Std.
		----- 22,5 Std.
Ausgießen		

8.5 Paraffinschnitt-Protokoll

Schnittmuster entsprechend dem Mausatlas, Beginn 1,8 mm nach dem Bregma:

110 Schnitte in 11 Ebenen mit 10 Kopien, Schnittdicke 4 µm

Schnitt	Mausatlas Bregma (in mm) 2,8 mm dann 1000 µm wegschneiden Schnitte im Abstand von 500 µm anfertigen
1a	1,8
2a	1,3
3a	0,8
4a	0,3
5a	0,2
6a	0,7
7a	-1,2
8a	-1,7
9a	-2,2
10a	-2,7
11a	-3,2

9 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank für das Gelingen dieser Arbeit gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

für die freundlichen Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin,

Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

für die Überlassung des Themas, die exzellente wissenschaftliche Betreuung und die hervorragende Unterstützung während meiner medizinischen Ausbildung,

Herrn Dr. med. Raimund Trabold

für die außergewöhnlich gute Betreuung und die stete Unterstützung meiner Vorträge sowie für die immer gute Arbeitsatmosphäre,

**Herrn Jérôme Badaut, PhD, Assistant Professor und
Frau Viorella Pop**

Loma Linda Universität, CA, USA

für die gute Kooperation und Analyse des immunhistochemischen Teils dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Baethmann

für die wissenschaftlichen Diskussionen auf zahlreichen Kongressen,

Herrn Dr. med. Seong Woong Kim

für die Einarbeitung in den Laboralltag,

Frau Dr. med. Nicole Terpolilli und Christian Brehm

für die Erhebung der physiologischen Parameter,

Frau Uta Mamrak

für die qualifizierte Hilfestellung und Unterstützung in allen Laborfragen und die akkurate Anfertigung zahlreicher Paraffinschnitte,

Frau Alke Schropp

für die Paraffineinbettung und Anleitung bei der Präparate-Herstellung,

Herrn Dr. vet. med. Eckart Thein und Mitarbeitern

für die Unterstützung und Geduld mit der knock-out Tierzucht,

Frau Dr. vet. med. Heike Beck

für den wissenschaftlichen Austausch bei der RT-PCR-Auswertung,

Frau Dr. vet. med Manuela Schneider

für die Unterstützung im Labor,

Herrn Dr. rer. biol. hum. Dipl. Phys. Jürgen Peters

für die statistische Beratung und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft,

dem Neuroteam

und allen Mitdoktoranden für den wissenschaftlichen Austausch,
die gemeinsame und prägende Zeit,

Frau Stephanie Schacht

für die orthographische Korrektur,

meiner Familie

für die Geduld und Unterstützung während der zurückliegenden Forschungszeit

und

Herrn Michael Eberhardt

für die Hilfe beim Layout und die immer liebevolle und motivierende Unterstützung.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Rauen, geb. Schmidt
Anschrift	Pilarstraße 5, 80638 München katrinrauen@web.de
geboren	am 23.12.1969 in Köln

Studium

10/2005 - 11/2011	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München (Note 2,16)
11/2006 - 06/2007	Co-Assistent im Histologiekurs, Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Famulaturen

02 - 03/2008	Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München
03 - 04/2009	Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München
08 - 09/2009	Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Starnberg
03 - 04/2010	Pädiatrie, Stellenbosch University, Tygerberg Academic Hospital, Kapstadt, Südafrika

Praktisches Jahr

08 - 10/2010	1. Tertial Chirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Campus Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität, München
10 - 12/2010	Neurochirurgie, Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München
12/2010 - 03/2011	2. Tertial Neurologie, UCL Institute of Neurology, Queen Square London, UK
04/2011 - 07/2011	3. Tertial Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz

Beruflicher Werdegang

1992 - 1997	staatlich anerkannte Krankengymnastin, Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße, Kliniken der Stadt Köln Vortragstätigkeit und Publikationen zur krankengymnastischen Behandlung schwerbrandverletzter Kinder im In- und Ausland, Mitglied im European Club for Pediatric Burns
1996	Tätigkeit und PNF-Weiterbildung am Kaiser Permanente Medical and Rehabilitation Center, Vallejo/Kalifornien, USA
1998 - 2006	staatlich anerkannte Krankengymnastin im Kinderzentrum München
1999 - 2004	Lehrassistentin der Internationalen Vojta Gesellschaft, e.V., Referententätigkeit im In- und Ausland
Seit 2004	Lehrtherapeutin der Internationalen Vojta Gesellschaft, e.V., Referententätigkeit im In- und Ausland

16.11.2011	Approbation als Ärztin
Seit 01.12.2011	Neurologische Facharztausbildung, Schön Klink Bad Aibling
Seit 06/2012	Aufnahme in das Mentoren-Programm der Deutschen Gesellschaft für Neurologie
Seit 08/2012	Medizinisch-wissenschaftliche Redakteurin der Jungen Neurologen, DGN Themenschwerpunkt: zerebrovaskuläre Erkrankungen und Anfallsleiden

Schul- und Ausbildung

Schule	in Leverkusen
1976 - 1980	Grundschule Fontanestraße
1980 - 1989	Carl-Duisberg-Gymnasium, Abitur (Note 1,6) mit großem Latinum

Berufsausbildung

1989	3-monatiges Pflegepraktikum, Städtisches Krankenhaus Leverkusen
1989 - 1991	Staatlich anerkannte Lehranstalt für Krankengymnastik an den Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1991 - 1992	Anerkennungspraktikum für Krankengymnastik an den Medizinischen Einrichtungen der Universität - Gesamthochschule - Essen

Soziales Engagement

2008 - 2010	Juniormentor, MeCuM-Mentor Programm, Ludwig-Maximilians-Universität, München
02 - 06/2009	Organisation der Doktorarbeitstage DoktaMed, Ludwig-Maximilians-Universität, München
04/2009 - 02/2011	Projekt-Organisation und Gestaltung: Arzt & Zukunft - Unternehmer sein und Arzt bleiben, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Seit 2002	Mitglied der Internationale Vojta Gesellschaft e.V.

11 Publikationen

Originalarbeiten

Rauen, K., Trabold, R., Brem, C., Terpolilli, N., Plesnila, N. Arginine vasopressin V_{1a} receptor deficient mice have reduced brain edema and secondary brain damage following traumatic brain injury. J. Neurotrauma, 2013, Aug 15.

Rauen, K., Pop, V., Trabold, R., Badaut, J., Plesnila, N. Vasopressin V_{1a} receptors regulate expression of aquaporins following experimental traumatic brain injury (in preparation).

Siebeck, M., **Rauen, K.**, von Einem, J. Medical Doctor with Future - An example of entrepreneurship at the Faculty of Medicine at Ludwig-Maximilians University in Munich (expected fall 2013).

Vorträge

- | | |
|---------|---|
| 07/2009 | „Einfluss von Vasopressin-Rezeptoren und Aquaporinen auf das sekundäre Nekrosevolumen nach Schädel-Hirntrauma“
Kolloquium des Instituts für Chirurgische Forschung
Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| 11/2009 | 1. Vortragspreis:
„Einfluss von Arginin-Vasopressin V _{1a} -Rezeptoren auf den sekundären Hirnschaden nach Controlled Cortical Impact im Mausmodell“
Jahrestagung der Sektion „Hirndruck, Hirndurchblutung, Hydrocephalus“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie,
Universitätsklinikum Homburg-Saar |
| 05/2010 | Doktorarbeitstage Medizin: Auswahl Plenarvortrag
„Einfluss von Vasopressin V _{1a} -Rezeptoren und Aquaporinen auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirntrauma - oder was macht den „signifikanten Unterschied“ einer medizinischen Doktorarbeit aus?“,
Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| 11/2010 | „Rolle der V _{1a} -Rezeptoren und Aquaporine in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach Controlled Cortical Impact im Mausmodell“
Jahrestagung der Sektion „Hirndruck, Hirndurchblutung, Hydrocephalus“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Unfallkrankenhaus Berlin |
| 10/2012 | Mechanismen der Aquaporin-Expression nach experimentellem Schädel-Hirntrauma
Jahrestagung der Sektion „Hirndruck, Hirndurchblutung, Hydrocephalus“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg |

Posterpräsentation

- | | |
|---------|--|
| 09/2009 | “Role of Arginine-Vasopressin-V _{1a} -Receptors for secondary brain damage following Controlled Cortical Impact in mice”
INTS – Internationaler und nationaler Neurotrauma Kongress
Santa Barbara, Kalifornien, USA |
| 05/2013 | “Mechanisms of aquaporin expression following experimental traumatic brain injury”
XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET
Brain 2013, Shanghai, China |